

Genetische Determinanten für die Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* gegen das neue Antibiotikum Vancoresmycin

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"  
genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Petra Becker

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:

30.05.08

Vorsitzender der Promotionskommission: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Bernhard Henrich
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2008  
(D386)

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ludwigshafen, 17.04.2008

Unterschätze niemals Feinde, weil sie klein und zahllos sind.  
Nicht Löwen und Krokodile töten die meisten Menschen,  
sondern Viren und Bakterien.

(Peter Hohl)

Meinen Eltern und Matthias

**I Inhaltsverzeichnis**

<b>I INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>II ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>VI</b>
<b>III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>2</b>
1.1.1 Systematik	2
1.1.2 Morphologie	3
1.1.3 Natürliche Kompetenz	4
1.1.4 Pathogenität	6
<b>1.2 Antimikrobielle Wirkstoffe und Resistenzmechanismen</b>	<b>6</b>
1.2.1 Wirkung antibakterieller Wirkstoffe	7
1.2.2 Resistenzmechanismen	9
1.2.3 Entwicklung neuer Antibiotika	12
<b>1.3 Tetramsäurederivate und das neue Antibiotikum Vancoresmycin</b>	<b>13</b>
1.3.1 Tetramsäurederivate	13
1.3.2 Isolation und Struktur von Vancoresmycin	14
1.3.3 Wirkungsspektrum von Vancoresmycin	16
<b>1.4 ABC-Transporter</b>	<b>16</b>
1.4.1 Struktureller Aufbau von ABC-Transportern	16
1.4.2 ABC-Exporter	18
1.4.3 ABC-Importer	20
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b>	<b>26</b>
2.2.1 Bakterienstämme	26
2.2.2 Plasmide	28
2.2.3 Oligonukleotide	28

---

<b>2.3</b>	<b>Nährmedien</b>	<b>32</b>
2.3.1	D-Blutagar	32
2.3.2	C-Medium (CpH8; nach Lacks und Hotchkiss, 1960)	32
2.3.3	LB-Medium	33
<b>2.4</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>34</b>
<b>2.5</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.5.1	Anzuchtbedingungen	34
2.5.2	Stammkonservierung	35
2.5.3	Wachstumsmessungen	35
2.5.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	35
2.5.5	Zellplattierungseffizienz (efficiency of plating, EOP)	36
2.5.6	Phasenkontrastmikroskopie	36
2.5.7	Makroskopische Analyse	36
2.5.8	Herstellung und Transformation natürlich kompetenter Zellen von <i>S. pneumoniae</i>	37
2.5.9	Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> (modifiziert nach Dower <i>et al.</i> , 1988)	37
2.5.10	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (modifiziert nach Hanahan, 1983)	38
2.5.11	Blau-Weiß-Screening	39
<b>2.6</b>	<b>Isolation, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren</b>	<b>40</b>
2.6.1	Isolation chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i> (modifiziert nach Marmur, 1961)	40
2.6.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	40
2.6.3	Phenolextraktion	41
2.6.4	DNA-Präzipitation	41
2.6.5	DNA-Elution aus Agarosegelen	42
2.6.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	42
2.6.7	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>S. pneumoniae</i>	42
2.6.8	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	44
2.6.9	Agarose-Gelelektrophorese	45
<b>2.7</b>	<b>Klonierungstechniken und DNA-Modifikation</b>	<b>46</b>
2.7.1	DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen	46
2.7.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase	46
2.7.3	Auffüllreaktion von kohäsiven Enden mit T4 DNA Polymerase	47
2.7.4	Phosphorylierung von 5'-Enden mit T4 Polynukleotidkinase	47
2.7.5	Ligation von DNA- und RNA-Molekülen	47
2.7.6	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	48
2.7.7	Reverse Transkription	53
2.7.8	DNA-Sequenzierung	53

---

<b>2.8</b>	<b>Erstellung und Screening von Fosmidgenbanken</b>	<b>54</b>
<b>2.9</b>	<b>Durchführung von Deletionen in <i>S. pneumoniae</i> mit Hilfe von Resistenzkassetten</b>	<b>58</b>
2.9.1	Deletion durch Integration der <i>aphIII</i> -Resistenzkassette	58
2.9.2	Deletion durch die Janusresistenzkassette	60
2.9.3	Übersicht über die Konstruktion von Deletionsstämmen	61
<b>2.10</b>	<b>Bestimmung des Transkriptionsstartes durch 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends)</b>	<b>63</b>
<b>2.11</b>	<b><math>\beta</math>-Galaktosidaseassay</b>	<b>67</b>
<b>2.12</b>	<b>Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford</b>	<b>70</b>
<b>2.13</b>	<b>Mikroarraybasierte Transkriptomanalyse</b>	<b>70</b>
2.13.1	Das <i>S. pneumoniae</i> R6 Oligonukleotid-Set	70
2.13.2	Herstellung der Biochips	71
2.13.3	Markierung der Hybridisierungsprobe	73
2.13.4	Hybridisierung der Probe auf Biochips	73
2.13.5	Einscannen der Biochips und Erfassung der Bilddaten	74
2.13.6	Datenanalyse und Datenauswertung	74
<b>2.14</b>	<b>Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)</b>	<b>75</b>
<b>2.15</b>	<b>Computergestützte Datenverarbeitung und –analyse</b>	<b>77</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung und phänotypische Charakterisierung vancoresmycinresistenter Labormutanten</b>	<b>79</b>
3.1.1	Isolierung vancoresmycinresistenter Labormutanten	79
3.1.2	Bestimmung der MHK der Mutanten für Vancoresmycin	80
3.1.3	Wachstumsverhalten der Mutanten und Morphologie in Flüssigkultur	81
3.1.4	Wachstumsverhalten der Mutanten nach Zugabe von Vancoresmycin	84
3.1.5	Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit genomischer DNA der Mutanten und Selektion auf Vancoresmycin	86
<b>3.2</b>	<b>Suche nach genetischen Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin mit Hilfe von Genbanken</b>	<b>87</b>
3.2.1	Erstellung und Screening von Genbanken	87
3.2.1.1	Genbank in dem high-copy-number Vektor pUH89	88
3.2.1.2	Genbank in dem low-copy-number Vektor pWSK129	91
3.2.1.3	Fosmidgenbank unter Verwendung des Vektors pCC1FOS	93

3.2.2	Analyse der Resistenzdeterminanten <i>rpsI</i> und <i>dexS</i>	104
3.2.2.1	Insertion des IS 10-R in das Gen <i>rpsI</i>	104
3.2.2.2	Insertion des IS 10-R in das Gen <i>dexS</i>	108
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit Hilfe von mikroarraybasierten Transkriptomstudien</b>	<b>114</b>
3.3.1	Auswertung der Transkriptomdaten	114
3.3.1.1	Vergleich der Mutante aR6 mit dem Referenzstamm R6	114
3.3.1.2	Vergleich der Mutante eR6 mit dem Referenzstamm R6	116
3.3.1.3	Vergleich der Mutante fR6 mit dem Referenzstamm R6	118
3.3.1.4	Vergleich der Mutante gR6 mit dem Referenzstamm R6	119
3.3.2	Analyse der im Transkriptomvergleich der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit dem Referenzstamm R6 aufgefallenen Gene	120
3.3.2.1	Analyse des Genes <i>copY</i> in den Mutanten aR6, eR6 und fR6	120
3.3.2.1.1	Austausch des Genes <i>copY</i> in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit Hilfe der Janusresistenzkassette und Bestimmung der EOP für Vancoresmycin	122
3.3.2.1.2	Transformation der <i>cop</i> -Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 in den sensitiven Rezipienten R6	124
3.3.2.1.3	Sequenzierung des Genes <i>copY</i> in aR6, eR6 und fR6	124
3.3.2.2	Analyse des Cyl-Operons in den Mutanten aR6, eR6 und fR6	125
3.3.2.2.1	Bioinformatische Analyse des Cyl-Operons	125
3.3.2.2.2	Deletion des Cyl-Operons in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 und Bestimmung der EOP für Vancoresmycin	128
3.3.2.3	Analyse des ABC-Transporter-Operons <i>orf1-abcAB</i> in der Mutante gR6	131
3.3.2.3.1	Identifizierung einer Punktmutation im Gen <i>abcB</i>	138
3.3.2.3.2	Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit der Sequenz des mutierten Genes <i>abcB</i> und Bestimmung der MHK der Transformanten für Vancoresmycin	139
3.3.2.3.3	Deletion des ABC-Transporter-Operons <i>orf1-abcAB</i> in R6, gR6 und gTR und Bestimmung der MHK für Vancoresmycin	140
3.3.2.3.4	Verifizierung der erhöhten Transkriptmengen von <i>abcA</i> und <i>abcB</i> in gR6 und gTR mit Hilfe von qRT-PCR	142
3.3.2.3.5	Bestimmung der Aktivität des Promotors P <sub>abc</sub> durch <i>lacZ</i> -Reporterfusionskonstrukte	143
3.3.2.3.6	Bestimmung der MHK für Bacitracin	146
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>150</b>
<b>4.1</b>	<b>Unterschiede der vancoresmycinresistenten Labormutanten</b>	<b>150</b>
<b>4.2</b>	<b>Genetische Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin</b>	<b>153</b>
4.2.1	Erstellung von Genbanken zur Identifizierung von Resistenzdeterminanten	153
4.2.1.1	Das Gen <i>rpsI</i>	155



---

4.2.1.2	Das Gen <i>dexS</i>	157
4.2.1.3	Das Insertionselement IS10-R	160
4.2.2	Transkriptomanalysen zur Identifizierung von Resistenzdeterminanten	161
4.2.2.1	Das Gen <i>copY</i>	161
4.2.2.2	Die Gene des Cyl-Operons	163
4.2.2.3	Das ABC-Transporter-Operon <i>orf1-abcAB</i>	164
4.2.3	Mögliche Eigenschaften des ABC-Transporters Orf1-AbcAB	169
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>173</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>175</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## II Zusammenfassung

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Antibiotikum Vancoresmycin handelt es sich um ein neuartiges Tetransäurederivat, das aus der Fermentationsbrühe des Aktinomyceten *Amycolatopsis vancoresmycina* gewonnen wurde. Da der Wirkungsmechanismus und mögliche Resistenzmechanismen unbekannt sind, soll diese Arbeit zu deren Aufklärung beitragen.

Dazu wurden verschiedene Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin in *Streptococcus pneumoniae* R6 analysiert. Zuerst wurden acht vancoresmycinresistente Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae* R6 bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Vancoresmycin isoliert und phänotypisch charakterisiert. Es konnte eine bakteriolytische Wirkung von Vancoresmycin auf *S. pneumoniae* gezeigt werden.

Zur Identifizierung genetischer Resistenzdeterminanten wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden Genbanken von der Mutante aR6 erstellt und nach der resistenzvermittelnden DNA-Sequenz durch Transformation des sensitiven Rezipienten *S. pneumoniae* R6 gesucht. Zum anderen wurden die Transkriptome der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit dem des Referenzstammes R6 durch mikroarraybasierte Studien verglichen, um Transkriptmengenunterschiede zu detektieren.

Durch das Screening der Genbanken konnten zwei Determinanten identifiziert werden, deren Funktionen durch Insertion des IS10-R-Elementes eingeschränkt waren. Dabei handelte es sich um das Gen *rpsI*, das für das kleine ribosomale Protein S9 codiert, und um das Gen *dexS*, das für eine Dextranglucosidase codiert. Der Stamm R6-*rpsI*::IS10-R zeichnete sich durch ein verlangsamtes Wachstum aus, was zu der beobachteten erhöhten Vancoresmycinresistenz beitragen könnte. Für das Gen *dexS* konnte eine direkte Beteiligung an der Resistenz gegenüber Vancoresmycin nicht nachgewiesen werden.

Durch einen Transkriptomvergleich der Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit dem Referenzstamm R6 wurde festgestellt, dass die Transkriptmengen des Genes *copY*, das für einen Transkriptionsrepressor codiert, und der Gene eines Cyl-Operons, deren Genprodukte vermutlich an der Bildung, Modifikation und Sezernierung eines Cytolysins beteiligt sind, in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 erhöht waren. Mit Hilfe ausführlicher Analysen wurde nachgewiesen, dass sowohl das Gen *copY* als auch die Gene des Cyl-Operons nicht direkt an einer Resistenz gegenüber Vancoresmycin beteiligt sind.

Im Transkriptom der Mutante gR6 fielen zwei Gene (*spr0812* = *abcA* und *spr0813* = *abcB*), die für einen ABC-Transporter codieren, durch erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptmengen des Referenzstammes R6 auf. Die Funktion dieses

ABC-Transporters bei der Resistenz gegenüber Vancoresmycin wurde detailliert analysiert, da ein Aminosäureaustausch im C-terminalen Ende der Permeaseuntereinheit AbcB in der Mutante gR6 identifiziert wurde (Gln<sub>581</sub> → Stop). Durch Transformation des Rezipienten R6 mit der entsprechenden DNA-Sequenz konnte für die Transformanten (gTR) eine erhöhte Vancoresmycinresistenz gezeigt werden. Außerdem konnte durch Deletion des ABC-Transporter-Operons in der Mutante gR6 eine MHK-Erniedrigung auf das Ausgangsniveau des Referenzstammes R6 herbeigeführt werden.

Die im Transkriptom der Mutante gR6 detektierten erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* wurden durch quantitative Real-Time-PCR verifiziert. In der Transformante gTR wurden ebenfalls erhöhte Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* nachgewiesen. Sowohl in der Mutante gR6 als auch in der Transformante gTR waren die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* etwa um das Sechsfache im Vergleich zu den jeweiligen Transkriptmengen des Referenzstammes R6 erhöht.

Um die Ursache der erhöhten Transkriptmengen aufzuklären, wurde die Promotoraktivität des ABC-Transporter-Operons in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR mit Hilfe von *lacZ*-Reporterfusionskonstrukten analysiert. Die Promotoraktivitäten in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR unterschieden sich nicht von der des Referenzstammes R6. Dieses Resultat lässt vermuten, dass die erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* nicht auf eine gesteigerte Promotoraktivität zurückgeführt werden können, sondern dass die Stabilität der Transkripte durch die Nonsensemutation in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR erhöht war.

In der Literatur werden homologe ABC-Transporter aus *Bacillus subtilis* bzw. *S. mutans* beschrieben, die in eine Resistenz gegenüber Bacitracin involviert sind (Ohki *et al.*, 2003; Tsuda *et al.*, 2002). Aufgrund dessen wurde eine Beteiligung des hier untersuchten ABC-Transporters an einer Bacitracinresistenz überprüft. Mit Hilfe einer MHK-Bestimmung für Bacitracin wurde ein fünffach erniedrigter MHK-Wert für die Mutante gR6 und für die Transformante gTR im Vergleich zum Referenzstamm R6 festgestellt. Das bedeutet, dass der mutierte ABC-Transporter der Mutante gR6 sowohl in eine erhöhte Resistenz gegenüber Vancoresmycin als auch in eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bacitracin involviert ist.

## III Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
<i>ad</i>	auf	log	logarithmisch
ADP	Adenosindiphosphat	M	Marker
Amp	Ampicillin	M	1 Molar
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz	MCS	multiple cloning site
ATP	Adenosintri-phosphat	MHK	minimale Hemmkonzentration(en)
ATPase	Adenosintri-phosphatase	min	Minute
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	mg	Milligramm
bp	Basenpaar(e)	ml	Milliliter
BSA	bovine serum albumine	mol	molar
BT	Bacitracin	N (Zahl)	Nephelo (Zahl)
C	Cytosin	NaAc	Natriumacetat
cDNA	copy DNA	NBD	Nukleotidbindende Domäne(n)
CFU	colony-forming units	NCBI	National Center for Biotechnology Information
Cam	Chloramphenicol	ng	Nanogramm
Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicolresistenz	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	nt	Nukleotide
CSP	competence-stimulating peptide	OD	optische Dichte
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat	<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat	P	Phosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtri-phosphat	qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat	p. a.	<i>pro analysi</i>
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat	PBP	Penicillin-Bindeprotein(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
DNase	Desoxyribonuklease	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasser- stoffionenkonzentration
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat	pmol	picomolar
DOC	Desoxycholat	RBS	Ribosomenbindestelle
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat	RNA	Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure	rpm	rotation per minute (Rotationen pro Minute)
EOP	efficiency of plating	RT	Raumtemperatur
ERG	Eppendorf-Reagenzgefäß	RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)	s	Sekunde
EtOH	Ethanol	S.	Streptococcus
G	Guanin	SBD	Substratbindedomäne(n)
g	SI Erdbeschleunigung (981cm s <sup>-2</sup> )	SBP	Substratbindeprotein(e)
g	Gramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	Wasser destilliert	Sp.	Species
HCl <sub>konz.</sub>	konzentrierte Salzsäure	SpC	Spectinomycin
hypoth.	hypothetisch		
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D- galactosid		
Kan	Kanamycin		

---

Spc <sup>R</sup>	Spectinomycinresistenz
SSB	single strand DNA binding protein
SSC- Puffer	sodium sodium-citrate-Puffer
ssDNA	einzelsträngige DNA
Str	Streptomycin
Str <sup>R</sup>	Streptomycinresistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCS	two-component-system Zweikomponentensystem(e)
TE	Transformationseffizienz
TE	Tris-EDTA
TEE	Tris-Essigsäure-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclinresistenz
TMD	Transmembrandomäne(n)
UDP	Uridindiphosphat
UE	Untereinheit(en)
UMP	Uridinmonophosphat
UP	Undecaprenolphosphat
UPP	Undecaprenolpyrophosphat
V	Spannung
VRM	Vancoresmycin
Vrm <sup>R</sup>	Vancoresmycinresistenz
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

*"There is probably no chemotherapeutic drug to which  
in suitable circumstances the bacteria cannot react  
by in some way acquiring 'fastness' [resistance]"*

Alexander Fleming, 1946

Eines der bekanntesten Antibiotika ist Penicillin, das von dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* produziert wird. Bereits im späten neunzehnten Jahrhundert wurden Versuche mit diesem Schimmelpilz durchgeführt, aber nicht weiter beachtet. Alexander Fleming (1881-1955) wurde viele Jahre später zufällig durch eine verschimmelte Bakterienkultur wieder auf diesen Pilz aufmerksam, da er darauf lysierte Staphylokokken vorfand. Die aus diesem Pilz gewonnene Substanz nannte Fleming Penicillin (Fleming, 1929). Weiterhin stellte er fest, dass dieser Stoff das Wachstum grampositiver Bakterien, wie Streptokokken und Staphylokokken, inhibierte, nicht aber das Wachstum gramnegativer Bakterien. Howard W. Florey (1898-1968) und Ernst B. Chain (1906-1979) griffen die Penicillinforschung auf und erhielten dafür 1945 zusammen mit Alexander Fleming den Nobelpreis.

Im Jahr 1941 wurde Penicillin in den Markt eingeführt. Bereits zwei Jahre später traten die ersten resistenten Stämme auf. Im Jahr 1960 zeigten schon mehr als 60% aller klinischen Staphylokokkenisolate eine Penicillinresistenz. In den Jahren 1965 und 1971 wurden die ersten resistenten klinischen Streptokokkenstämme in Boston, Papua-Neuginea und Australien isoliert (Kislak *et al.*, 1965; Hansman & Bullen, 1967; Hansman *et al.*, 1974).

Neben Penicillin wurden Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts die meisten heute noch verwendeten Antibiotika wie z. B. Tetracyclin und Streptomycin erforscht und kommerziell vertrieben. Penicillin in seiner ursprünglichen Form und auch die anderen Antibiotika wurden vielfach modifiziert, um das Wirkungsspektrum zu vergrößern und um Resistenzen entgegenzuwirken.

Doch wie schon Alexander Fleming 1946 bemerkt hatte (Zitat siehe oben), ist es nur eine Frage der Zeit, wann sich Resistenzen gegen ein therapeutisch genutztes Antibiotikum entwickeln, und nicht ob (Davies, 1996). So wurden 1977 die ersten multiresistenten Pneumokokken, die eine Resistenz gegen Tetracyclin, Erythromycin und Chloramphenicol zeigten, entdeckt (Jacobs *et al.*, 1978). Seitdem nimmt die Entwicklung resistenter und multiresistenter Stämme wie z. B. die der MRSA-Stämme (methicillinresistente *Staphylococcus aureus*, MRSA) und die der VRE-Stämme (vancomycinresistente Enterococci, VRE) rasant zu.

Aufgrund dieser Resistenzentwicklung besteht immerzu der Bedarf neue antibakterielle Wirkstoffe zu isolieren und zu erforschen. Allerdings zogen sich in den 80er und 90er Jahre sehr viele Pharmakonzerne aus der Erforschung neuer Wirkstoffe aufgrund mangelnder Rentabilität zurück. Eine Entwicklung, die durch die Verbreitung resistenter Stämme langfristig zu fatalen Folgen führen könnte.

In jüngster Zeit werden wieder neue Versuche unternommen, neue bisher nicht bekannte Wirkstoffe zu identifizieren und zu erforschen. Im Zuge dieser Forschung wurde das neuartige Antibiotikum Vancoresmycin von der Firma Sanofi-Aventis GmbH (Frankfurt) isoliert und in dieser Arbeit an dem humanpathogenen Erreger *Streptococcus pneumoniae* weiter untersucht.

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Im Jahr 1881 gelang es dem französischen Biologen Louis Pasteur (1822-1895; Pasteur 1881) und dem Amerikaner George Sternberg (1838-1915; Sternberg, 1881) zeitgleich und unabhängig voneinander ein Bakterium der Gattung *Streptococcus* zu isolieren. Es handelte sich dabei um *Streptococcus pneumoniae*, das damals noch unter dem Namen *Streptococcus lanceolatum* bzw. *Diplococcus pneumoniae* geführt wurde. Die Zusammenhänge von *S. pneumoniae* mit Krankheiten wie z. B. Lungen-, Mittelohr-, Nebenhöhlen- und Hirnhautentzündung waren damals nur unzureichend bekannt, wurden aber seitdem kontinuierlich aufgeklärt.

### 1.1.1 Systematik

*Streptococcus pneumoniae* ist ein grampositives Bakterium aus der Abteilung der *Firmicutes*. Innerhalb der *Firmicutes* gehört *S. pneumoniae* der Klasse der *Bacilli* an, und darin zur Ordnung der *Lactobacillales* (Milchsäurebakterien). *S. pneumoniae* wird in die Familie der *Streptococcaceae* eingeordnet, und hier wiederum zur Gattung *Streptococcus* gerechnet. Bei dieser Gattung handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe, da zu ihr sowohl pathogene Krankheitserreger wie z. B. *S. pneumoniae* als auch kommensale Bewohner wie z. B. *S. mitis* gezählt werden (Köhler, 2007; Hoskins *et al.*, 2001). Alle Mitglieder der Gattung *Streptococcus* zeichnen sich durch einen niedrigen GC-Gehalt (34 - 46 mol%), durch aerotolerante Anaerobitat und durch einen homofermentativen Stoffwechsel mit Milchsäure als Hauptprodukt aus.

Die Einteilung der Gattung *Streptococcus* erfolgt klassisch nach ihrem Hämolyseverhalten (Brown, 1919) und ihrer Lancefieldgruppierung (Lancefield, 1933). Bakterien, die zur  $\beta$ -Hämolyse fähig sind, können das im Blutagar vorhandene Hämoglobin durch das von ihnen gebildete Streptolysin O bzw. Streptolysin S vollständig abbauen. Um die Kolonie ist eine deutliche Hamolysezone zu sehen, wie z. B. bei *S. pyogenes* und *S. agalactiae*. Bakterien,

die auf Blutagar eine  $\alpha$ -Hämolyse zeigen, sind nicht in der Lage Streptolysin O oder S zu bilden. Dadurch wird das im Blutagar enthaltene Hämoglobin nicht vollständig abgebaut, sondern zu Methämoglobin reduziert. Es entsteht eine vergrünte Zone um die Kolonien, wie z. B. bei *S. pneumoniae*, *S. mutans* und *S. mitis*. Bakterien, die kein Hämolyseverhalten zeigen, werden als  $\gamma$ -hämolytisch bezeichnet, wie z. B. *S. salivarius*. Das Hämolyseverhalten ist jedoch von mehreren Faktoren wie z. B. Blut, Zusammensetzung des Mediums und Sauerstoffbedingungen abhängig (Hardie & Whiley, 1995), so dass diese Differenzierungsmethode nicht immer eindeutig ist.

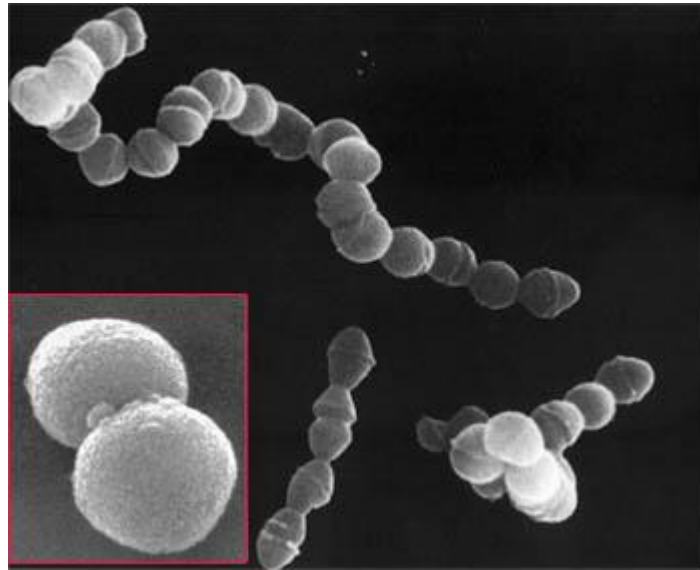
Die Lancefieldgruppierung wurde in den frühen 30er Jahren von Rebecca Lancefield (1895-1981) eingeführt, um  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken anhand ihrer Kohlenhydratantigene zu spezifizieren. Diese Typisierungsmethode beruht auf der Möglichkeit, spezifische Zellwand- und Zelloberflächenantigene mit entsprechenden Antiseren nachzuweisen. Die Lancefieldgruppen werden von A bis Z bzw. ohne Gruppe unterschieden, und diese wiederum werden in Serotypen unterteilt. Jedoch ist eine Differenzierung der gesamten Gattung mit Hilfe der Lancefieldgruppierung weniger geeignet, da einige Arten wie z. B. *S. pneumoniae* nicht erfasst werden.

Aufgrund der Nachteile der klassischen Methoden, wird die Differenzierung heutzutage auch mit modernen molekularbiologischen Methoden wie z. B. DNA-DNA-Hybridisierung, DNA-Sequenzierung, 16S rRNA-Sequenzanalysen (Kawamura *et al.*, 1995) und MLST-Analysen (Mavroidi *et al.*, 2007; Bentley *et al.*, 2006) durchgeführt. Diese Methoden erlauben eine wesentlich genauere Einteilung. Unterstützend werden morphologische und physiologische Methoden eingesetzt.

### 1.1.2 Morphologie

Pneumokokken wachsen kokkoid in unterschiedlich langen Ketten (Abb. 1. 1, großes Bild) oder als Diplokokken (Abb. 1. 1, kleines Bild links unten). Die Zellen sind rundlich und unbeweglich und haben einen Zelldurchmesser von 0,5 bis 1,5  $\mu\text{m}$ . Sie bilden keine Sporen und sind Optochin-empfindlich sowie Katalase-negativ. Auf Blutagar wachsen sie in  $\alpha$ -hämolisierenden, grüngelben und vertieften, bei Bekapselung in schleimigen Kolonien. Die Vertiefung kommt durch eine schnelle, partielle Autolyse in der stationären Phase zustande, die v. a. durch das LytA-Enzym, eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase, verursacht wird (Patterson, 1996; Höltje & Tomasz, 1976; Garcia *et al.*, 1986).





**Abb. 1. 1: *Streptococcus pneumoniae***

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von in Ketten wachsenden Streptokokken (großes Bild) und von einer Diplokokke (kleines Bild, unten links).

(<http://www.kennislink.nl>)

Bekapselte *S. pneumoniae* Stämme bilden eines von über 91 bekannten Kapselpolysacchariden, das ihren Serotyp definiert (Mavroidi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Bentley *et al.*, 2006). Die Kapsel stellt einen der wichtigsten Virulenzfaktoren dar, da sie das Bakterium vor Wirtsabwehrmechanismen schützt (siehe 1.1.4).

Der in dieser Arbeit verwendete apathogene Stamm *S. pneumoniae* R6 ist ein unbekapselter Stamm, bei dem es sich um ein Derivat eines klinischen Isolats von Typ2, Kapsel S, handelt, mit dem schon Avery arbeitete (Hoskins *et al.*, 2001; Avery *et al.*, 1944).

### 1.1.3 Natürliche Kompetenz

Natürliche Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit einer Zelle DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Zu den natürlich kompetenten Bakterien gehören u. a. die gramnegativen Arten *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae* sowie die grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* (Dubnau, 1999, Solomon & Grossman, 1996).

Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um ein natürlich kompetentes Bakterium, das durch DNA-Aufnahme und Genomintegration seinen Phänotyp verändern kann. Im Gegensatz zu anderen kompetenten Bakterien besteht diese Fähigkeit bei *S. pneumoniae* nicht über die gesamte Wachstumsphase, sondern nur in einer kurzen Phase während des exponentiellen Wachstums (Tomasz & Hotchkiss, 1964). Die DNA-Aufnahme mit anschließender

Genomintegration erfolgt durch das Zusammenspiel einiger Genprodukte, die in die DNA-Bindung, DNA-Fragmentierung, DNA-Aufnahme und Genomintegration involviert sind (Håvarstein *et al.*, 1997; Bergé *et al.*, 2003; Mortier-Barrière *et al.*, 2007).

Während der kompetenten Phase bindet doppelsträngige DNA an die Zelloberfläche, die anschließend durch membrangebundene Endonukleasen in ca. 8 kb Stücke fragmentiert wird (Morrison & Guild, 1973; Méjean & Claverys, 1993). Die beiden Stränge werden voneinander getrennt, wobei ein Strang in 5' – 3' Richtung abgebaut wird und der zweite Strang linear in 3' - 5' Richtung in die Zelle aufgenommen wird (Méjean & Claverys, 1988). Das DNA-Fragment wird an ein 'single-stranded DNA binding protein' gebunden, um den Abbau durch die intrazellulären Nukleasen zu verhindern (Morrison & Mannarelli, 1979). Homologe DNA wird über den RecA-vermittelten Rekombinationsweg in das Genom integriert, heterologe DNA hingegen wird metabolisiert (Mortier-Barrière *et al.*, 1998).

Die an der Kompetenz beteiligten frühen Genprodukte, die durch die Operons *comAB* und *comCDE* codiert werden, werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern mit Hilfe eines Quorum-Sensing-Mechanismus reguliert (Pestova *et al.*, 1996; Morrison & Lee, 2000). Das Pheromon CSP (competence stimulating protein), das von *comC* codiert wird, wird durch den von *comA* und *comB* codierten ABC-Transporter nach außen transportiert, wobei es prozessiert wird. Aus dem ehemals 41 AS langen ComC-Genprodukt, das mit einem Doppel-Glycin-Signalpeptid versehen ist, werden 24 AS durch die N-terminale proteolytische Domäne des ComA-Proteins abgespalten (Håvarstein *et al.*, 1995; Hui *et al.*, 1995). In nicht kompetenten Zellen wird *comCDE* in sehr geringen Mengen transkribiert (Pestova *et al.*, 1996). Die Kompetenz wird dann induziert, wenn die extrazelluläre CSP-Konzentration eine kritische Konzentration (1 - 10 ng/ml) überschreitet (Håvarstein *et al.*, 1995). Dadurch erhält die Histidinkinase, die durch *comD* codiert wird, ein Signal, das eine Aktivierung des Responseregulators ComE durch Phosphorylierung zur Folge hat. Der phosphorylierte Responseregulator aktiviert die Transkription der Operons *comAB* und *comCDE* durch Bindung an einen aufwärts liegenden Sequenzbereich des jeweiligen Promotors (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996; Ween *et al.*, 1996). Es folgt eine explosionsartige CSP-Freisetzung, die zu einer simultanen Kompetenzinduktion bei allen Zellen in einer Kultur führt.

Die Gene *comAB* und *comCDE*, die eine Kompetenzinduktion bewirken, werden als frühe Kompetenzgene bezeichnet. Daneben gibt es noch die späten Kompetenzgene (Peterson *et al.*, 2000; Rimini *et al.*, 2000), die die Proteine codieren, die für die DNA-Bindung, DNA-Prozessierung, DNA-Aufnahme und Genomintegration essentiell sind. Die Regulation dieser Gene erfolgt durch den alternativen Sigmafaktor ComX, dessen Transkription ebenfalls durch den phosphorylierten Responseregulator ComE in Gang gesetzt wird. Durch Bindung des ComX an eine stark konservierte sog. cin-Box (competence-induced), die sich im

Promotorbereich der späten Kompetenzgene befindet, wird die Transkriptionsmaschinerie gestartet (Lee & Morrison, 1999; Luo & Morrison, 2003).

Die Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae* ist vom pH-Wert (Chen & Morrison, 1987), von der Konzentration zweiwertiger Ionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) (Seto & Tomasz, 1976; Trombe, 1993; Dintilhac *et al.*, 1997), vom Phosphatgehalt (Novak *et al.*, 1999) und vom BSA-Gehalt des Wachstumsmediums, sowie von der Kapseldicke (Ravin, 1959) abhängig.

#### 1.1.4 Pathogenität

*S. pneumoniae* ist einer der wichtigsten humanpathogenen Erreger. Weltweit sterben pro Jahr drei bis fünf Millionen Menschen an Infektionen durch Pneumokokken (Tomasz, 1997).

*S. pneumoniae* kolonisiert kommensalisch die Schleimhäute des menschlichen Nasen- und Rachenraumes. Wenn das Immunsystem geschwächt ist, kann *S. pneumoniae* als opportunistischer Krankheitserreger Pneumonie (Lungenentzündung), Meningitis (Hirnhautentzündung), Otitis media (Mittelohrentzündung) und Sinusitis (Nasennebenhöhlenentzündung) auslösen. Besonders Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen sind von Pneumokokkeninfektionen betroffen.

Auf der Zelloberfläche von Bakterien befinden sich Proteine bzw. Enzyme, die für ihre Pathogenität kennzeichnend sind. Diese Proteine interagieren zum einen direkt mit dem Wirtsgewebe oder sie kaschieren die bakterielle Oberfläche, um das Bakterium vor Wirtsverteidigungsmechanismen zu schützen (Jedrzejewski, 2001). Als bedeutendster Pathogenitätsfaktor in *S. pneumoniae* gilt die Polysaccharidkapsel, da diese die Aufnahme und Verdauung durch Makrophagen beeinträchtigt (Muscher *et al.*, 2000). Bekapselte Pneumokokken-Stämme, sind pathogen, im Gegensatz zu unbekapselten apathogenen Stämmen. Besonders virulent sind daher Stämme, deren Kapselbildung sehr ausgeprägt ist, wie z. B. bei Stämmen des Serotyps 3 (Lawrenson *et al.*, 1988, Mufson *et al.*, 1974). Weitere wichtige Pathogenitätsfaktoren sind die Hyaluronatlyase (Hyl), das Pneumolysin (Ply), das Major Autolysin (LytA), die IgA1-Protease, die Neurominidasen NanA und NanB, das Cholinbindeprotein A (CbpA), das Pneumococcal Oberflächenantigen A (PsaA) sowie die Zelloberflächenadhäsine PspC und PspA (Jedrzejewski, 2001; Brooks-Walter *et al.*, 1997).

## 1.2 Antimikrobielle Wirkstoffe und Resistenzmechanismen

Im ursprünglichen Sinne handelt es sich bei Antibiotika um niedermolekulare Stoffe, die von Pilzen oder Bakterien gebildet werden, um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu hemmen bzw. um diese abzutöten. Zwar konnten im Laufe der Zeit sehr viele Antibiotika isoliert werden, aber davon waren weniger als ein Prozent in der Medizin von praktischem Nutzen. Unter diesen Stoffen waren Substanzen wie Penicillin, Tetracyclin, Vertreter der

Aminoglycoside und Makrolide, die auch heute noch zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt werden. All diese Stoffe werden in elf Substanzklassen eingeteilt. Um das Wirkungsspektrum zu erweitern und um entstandene Resistenzmechanismen entgegenzuwirken, wurden viele Substanzen chemisch modifiziert, wie z. B. Penicillin oder Tetracyclin. Neben den eigentlichen Antibiotika gibt es auch chemisch synthetisierte Substanzen durch die bakterielle Infektionen wirkungsvoll bekämpft werden können. Dazu gehören die Wachstumsfaktoranaloga, wie z. B. die Sulfonamide, Isoniazid oder Fluoruracil, und die Gyraseinhibitoren, wie z. B. die Vertreter der Chinolone. Viele Antibiotika werden heute nicht mehr aus dem entsprechenden Mikroorganismus isoliert, sondern vollständig chemisch synthetisiert.

Im allgemeinen Sprachgebrauch werden chemisch synthetisierte antimikrobielle Stoffe oft mit Antibiotika gleichgesetzt. Antibiotika und chemisch synthetisierte antimikrobielle Stoffe werden auch unter dem Begriff Antiinfektiva zusammengefasst.

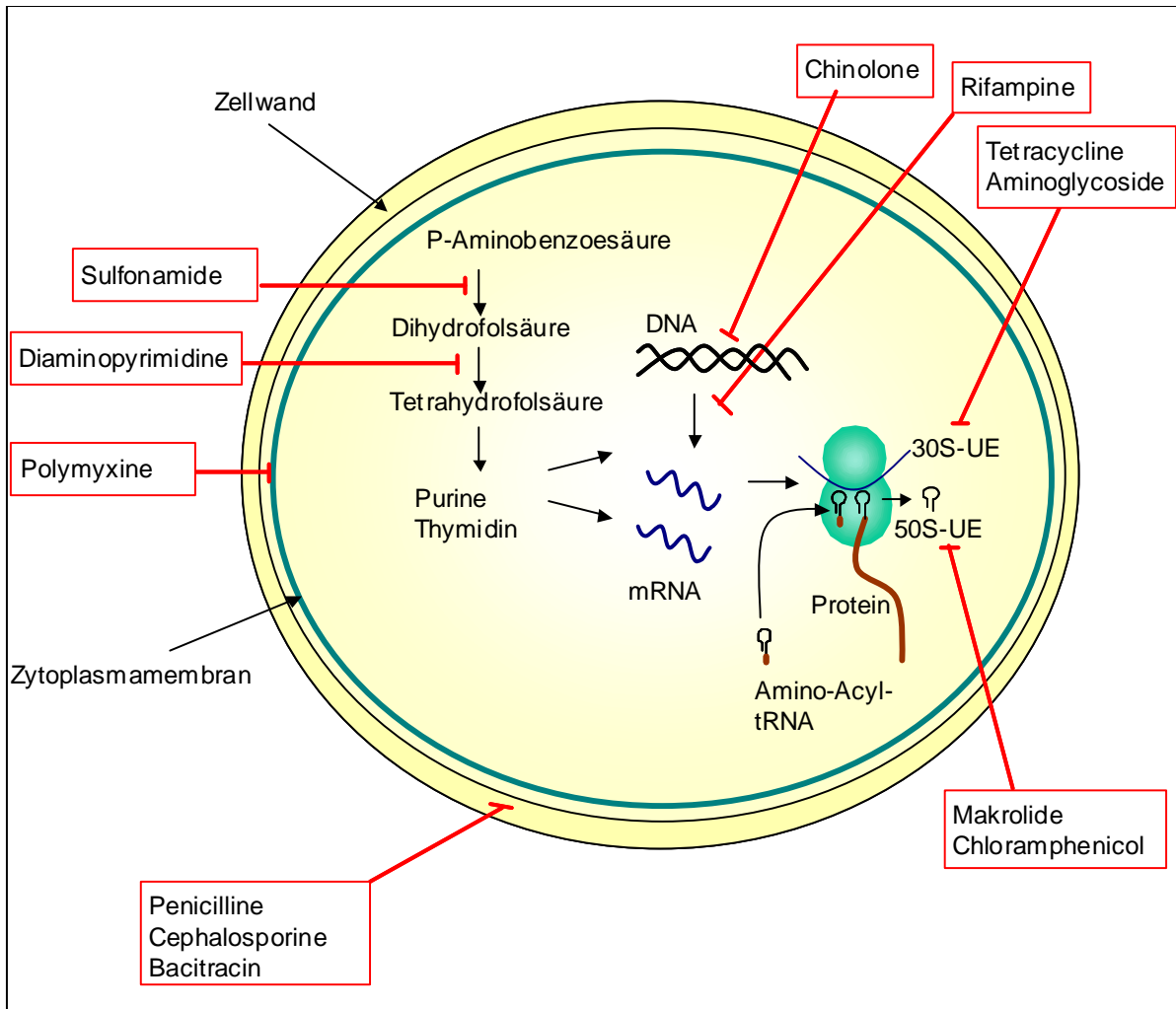
### 1.2.1 Wirkung antibakterieller Wirkstoffe

Um antibakterielle Wirkstoffe therapeutisch nutzen zu können, müssen diese die Eigenschaft der selektiven Toxizität besitzen. Das bedeutet, dass diese Substanzen die pathogenen Erreger abtöten oder zumindest ihr Wachstum einschränken, aber nicht die Wirtszellen schädigen. Diese Eigenschaft kommt durch den Eingriff der Antibiotika in bakteriell spezifische Prozesse, wie z. B. Zellwandsynthese, Proteinbiosynthese und Replikationsmaschinerie zustande. Anhand der folgenden Abbildung (Abb. 1. 2) wird schematisch aufgezeigt, an welchen zellulären Zielstrukturen antibakterielle Wirkstoffe angreifen können. Die Nukleinsäuresynthese wird z. B. durch die Chinolone Nalidixinsäure und Norfloxacin durch Hemmung des bakteriellen Enzyms DNA-Gyrase abgebrochen (Maxwell, 1997). Rifampine inhibieren die DNA-abhängige RNA-Polymerase durch Bindung an deren  $\beta$ -Untereinheit (Hartmann *et al.*, 1967, Umezawa *et al.*, 1968).

Durch die unterschiedlichen Ribosomenkomponenten von Prokaryoten und Eukaryoten gibt es viele Antibiotika, die an den verschiedenen Strukturen der bakteriellen Ribosomen angreifen (Weisblum & Davies, 1968): Die Aminoglykoside, wie z. B. Kanamycin, Streptomycin und Gentamicin, bewirken die Anlagerung falscher Amino-Acyl-tRNAs, so dass es zur Bildung falscher Proteine kommt (Davies, 1965; Davies & Davis, 1968, Yoshizawa *et al.*, 1998). Tetracycline wie z. B. Doxycyclin und Minocyclin unterbinden die Anlagerung von Aminoacyl-tRNAs an die A-Stelle, so dass die Elongation der Peptidkette beeinträchtigt wird (Chopra *et al.*, 1992). Die Makrolide inhibieren die Proteinsynthese, indem sie die Translokation blockieren (Brisson-Noël A. *et al.*, 1988). Chloramphenicol hemmt die Peptidyltransferase, wodurch die Elongation verhindert wird (Bergmann & Sicher, 1952; Allison *et al.*, 1962).

Der Tetrahydrofolsäure Syntheseweg, der u. a. zur Bildung von Purinen bzw. Thyminen führt, kann durch Sulfonamide und Diaminopyrimidine, z. B. Trimethoprim, gehemmt werden.

Durch manche Peptidantibiotika, wie z.B. Polymyxin, die die Permeabilität erhöhen, wird die Zytoplasmamembran geschädigt, so dass es zu einem Verlust von niedermolekularen Stoffen und zu einem Wassereinstrom kommt (Newton, 1956).



**Abb. 1. 2: Zelluläre Zielstrukturen antibakterieller Substanzen (schematische Darstellung)**

(Beschreibung siehe Text; Abb. modifiziert nach Lüllmann & Mohr, 1999).

Besonders hervorzuheben sind die in die Zellwandsynthese eingreifenden  $\beta$ -Lactamantibiotika, die als Mittel der Wahl bei Pneumokokkeninfektionen eingesetzt werden, und das Peptidantibiotikum Bacitracin.

Zu den  $\beta$ -Lactamantibiotika gehören die Vertreter der Penicilline, Carbapeneme, Monobactame und Cephalosprine. Sie zeichnen sich durch einen stickstoffhaltigen Vierring, den  $\beta$ -Lactamring, aus. Die bakteriozide Wirkung der  $\beta$ -Lactamantibiotika beruht auf der Inhibierung der Peptidoglycansynthese in sich teilenden Bakterienzellen. Sie inhibieren

die Aktivität der Penicillin-Bindeproteine (PBP), die u. a. für die Quervernetzung des Peptidoglycans durch Transpeptidierung verantwortlich sind. Bei den  $\beta$ -Lactamantibiotika handelt es sich um kompetitive Hemmstoffe, die unter Öffnung des  $\beta$ -Lactamringes kovalent an den Hydroxylrest des Serins im aktiven Zentrum der PBP binden. Dabei entsteht ein stabiler, langlebiger Acyl-Enzym-Komplex (Penicilloyl- bzw. Cephalosporinyl-Enzym-Komplex), in dem das PBP in einer inaktiven Form vorliegt und für die Peptidoglycanbiosynthese nicht mehr zur Verfügung steht. Die Zellwand wird zwar weiterhin gebildet, aber nicht mehr quervernetzt, wodurch die Zelle erheblich an Stabilität verliert. (Tipper & Strominger, 1965). Während der Behandlung von  $\beta$ -Lactamen werden außerdem Autolysine aktiviert, die die bestehende Zellwand verdauen (Tomasz, 1979). Die Bakterienlyse wird letzten Endes durch den osmotischen Druckunterschied zwischen dem Zellinneren und der äußeren Umgebung verursacht.

Bei Bacitracin handelt es sich um ein Gemisch aus mindestens neun Glycopeptiden, das von *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* produziert wird. Das im Handel erhältliche Bacitracin enthält mind. 70% des Bacitracins A. Seine Aktivität richtet sich gegen grampositive Bakterien sowie gegen Neisserien und *Haemophilus influenzae*. Das Wachstum anderer gramnegativer Bakterien wird durch Bacitracin nicht gehemmt. In der Medizin findet es aufgrund nephrotoxischer Eigenschaften keine systemische Anwendung, sondern nur lokale Anwendung bei Infektionen der Haut und der Schleimhäute. Oft wird es in Kombination mit Neomycin eingesetzt (Lüllmann & Mohr, 1999). In Gegenwart zweiwertiger Metallionen bindet Bacitracin an Undecaprenylpyrophosphat (UPP), wodurch die Peptidoglycansynthese zum Erliegen kommt (Stone & Strominger, 1971). Bei Undecaprenylphosphat (UP) handelt es sich um ein Karriermolekül, das die Peptidoglycanbausteine (Disaccharid-Pentapeptid) durch die Membran transportiert. Nach Abgabe der Peptidoglycanbausteine liegt der Carrier als UPP vor. UPP wird durch eine UPP Phosphatase dephosphoryliert, so dass UP seine Transportfunktion wieder aufnehmen kann. Sobald es zu einer Komplexierung von UPP mit Bacitracin gekommen ist, steht der Carrier für den Transport der Peptidoglycanbausteine nicht mehr zur Verfügung und die Zellwandsynthese bricht ab.

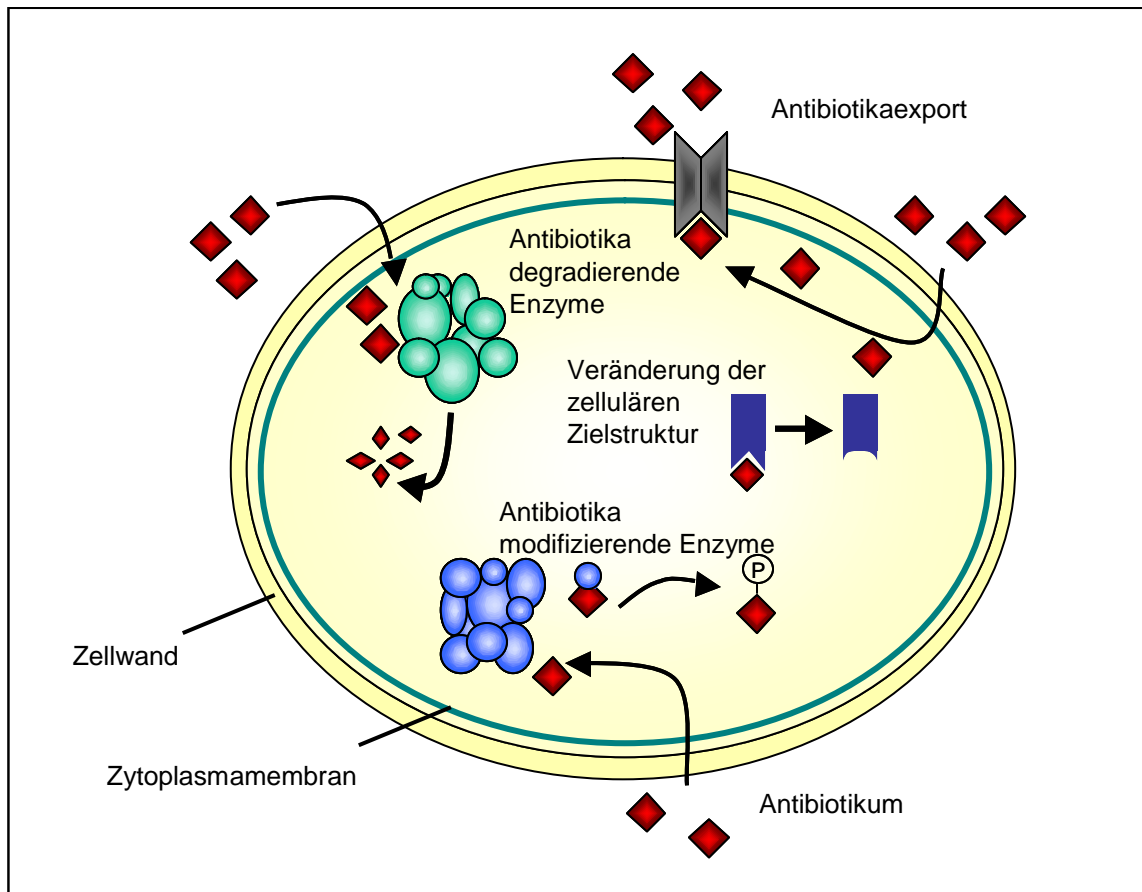
### 1.2.2 Resistenzmechanismen

Innerhalb kurzer Zeit nach Einführung verschiedener Antibiotika wurde bereits das Auftreten von Resistenzmechanismen festgestellt. Das Auftreten resistenter klinischer Stämme war der Beginn der Forschung an bakteriellen Resistenzmechanismen. Die Selektionierung von Resistenzen ist dabei eine Folge der Anpassung der Mikroorganismen an Umweltbedingungen (Walsh, 2000). Die Ursache ist v. a. auf den Missbrauch und der falschen Verwendung von Antibiotika zurückzuführen.

Durch die Aufklärung von Resistenzmechanismen können bestehende Resistenzmechanismen umgangen werden, indem z. B. Antibiotika chemisch modifiziert werden oder neue Antibiotika ausgewählt werden. Des Weiteren können dadurch mögliche zelluläre Zielstrukturen neuer Antibiotika erschlossen werden, deren Wirkungsweise bisher unbekannt war.

Es wird zwischen Primärresistenz (intrinsische Resistenz) und Sekundärresistenz (extrinsische Resistenz) unterschieden (Aleksun & Levy, 2007). Primärresistenz bezeichnet eine stabile genetische Eigenschaft, die chromosomal codiert ist und bei allen Vertretern einer Spezies immer vorhanden ist. Beispiele dafür stellen MDR-Transporter (Multi Drug Resistance, MDR) oder  $\beta$ -Lactamasen gramnegativer Bakterien dar (Aleksun & Levy, 2007). Extrinsische Resistenz wird zum einen durch horizontalen Gentransfer und zum anderen durch Spontanmutationen im Genom selektioniert. Durch horizontalen Gentransfer werden Resistenzgene durch Transformation, Transduktion oder Konjugation übertragen, so dass ein ehemals sensitiver Organismus resistent gegenüber einem oder mehreren Antibiotika werden kann (Aleksun & Levy, 2007, Chi *et al.*, 2007). Die Fähigkeit des horizontalen Gentransfers führte schließlich zum Auftreten multipler resistenter Bakterienstämme (Bax *et al.*, 2000).

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick der wichtigsten bakteriellen Resistenzmechanismen gegeben, die an Hand einer schematischen Darstellung (Abb. 1. 3) verdeutlicht werden. Zu diesen Mechanismen gehören Effluxsysteme, antibiotikamodifizierende bzw. -degradierende Enzyme und Veränderung der zellulären Zielstruktur.



**Abb. 1. 3: Potentielle bakterielle Resistenzmechanismen (schematische Darstellung)**

Beschreibung siehe Text (Abb. modifiziert nach [www.scq.ubc.ca/attack-of-the-superbugs-antibiotic-resistance](http://www.scq.ubc.ca/attack-of-the-superbugs-antibiotic-resistance)).

McMurry beschrieb 1980 zum ersten Mal einen effluxbasierten Resistenzmechanismus (McMurry *et al.*, 1980). Dabei stellte er fest, dass Tetracyclin durch plasmidcodierte Effluxtransporter nach draußen transportiert wurde. Seitdem wurden sowohl in grampositiven als auch in gramnegativen Bakterien Transportproteine entdeckt, die antimikrobielle Substanzen exportieren, um sich vor deren Wirkung zu schützen. Die meisten dieser Transportproteine können in fünf Proteinfamilien eingeordnet werden: 1) 'resistance-nodulation-cell-division' Familie (RND), 2) 'major facilitator' Familie (MF) 3) 'staphylococcal/small mutlidrug resistance' Familie (SMR), 4) 'ATP-binding cassette' Familie (ABC) und 5) 'multidrug and toxic compound extrusion' Familie (MATE) (Li & Nikaido, 2004). Stoffe, wie z. B. Tetracyclin oder Erythromycin werden schneller exportiert als sie nach innen diffundieren können, wodurch die intrazelluläre Konzentration niedrig gehalten und die Zelle nicht geschädigt wird (Walsh, 2000). Oft werden Effluxtransporter verstärkt exprimiert, um das Substrat effektiv nach draußen zu transportieren (Walsh, 2000). Diese Transporter sind den essentiellen Membranpumpen, die ubiquitär vorkommen und zum Transport lipophiler und amphipatischer Moleküle dienen, sehr ähnlich (Walsh, 2000). Einige Vertreter der ABC-



Transporter Superfamilie sind auf den Transport antimikrobieller Substanzen spezialisiert (siehe 1.4).

Eine weitere Strategie, sich gegen ein Antibiotikum zu schützen, besteht in der enzymatischen Inaktivierung bzw. Degradierung des Antibiotikums. Bekanntestes Beispiel dafür sind die  $\beta$ -Lactamasen (Barber, 1947), die die  $\beta$ -Lactamantibiotika inaktivieren, indem sie den für die antimikrobielle Wirkung essentiellen  $\beta$ -Lactamring hydrolysieren. Dadurch kann der  $\beta$ -Lactamring nicht an die PBP binden, und die Peptidoglycansynthese wird nicht unterbrochen (siehe 1.2.1). Inzwischen sind viele  $\beta$ -Lactamasen bekannt, die zum einen auf Plasmiden und Transposons codiert sein können und durch horizontalen Gentransfer verbreitet werden (Jacoby & Munoz-Price, 2005, Alekshun & Levy, 2007) und die zum anderen intrinsische Resistenz vermitteln wie z. B. *ampC* codierte  $\beta$ -Lactamasen bei gramnegativen Bakterien (Barber, 1947; Alekshun & Levy, 2007).

Im Gegensatz zu den Penicillinen werden Aminoglycoside nicht hydrolysiert, sondern durch enzymatische Modifikation inaktiviert. Adenyltransferasen, Phosphoryltransferasen und Acetyltransferasen verändern das Antibiotikum durch Anhängen einer entsprechenden Seitenkette, so dass das modifizierte Aminoglycosid nicht mehr am Ribosom binden kann (Davies & Wright, 1997).

Resistente Bakterien können sich vor Antibiotika auch durch Veränderung der zellulären Zielstruktur schützen. Bekanntestes Beispiel dafür sind die PBP, deren Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamen durch Modifikation ihrer Aminosäuresequenz erniedrigt wird (Dowson *et al.*, 1990; Grebe & Hakenbeck, 1996; Hakenbeck *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Entwicklung neuer Antibiotika

Aufgrund der Entwicklung neuer Resistenzmechanismen und der Verbreitung resistenter Stämme besteht die Notwendigkeit neue antimikrobielle Wirkstoffe zu identifizieren, die die Bekämpfung resistenter Stämme ermöglichen. Deshalb liegt das Interesse der Forschung vor allem an der Identifizierung neuer Leitstrukturen.

Auf der Suche nach neuartigen Substanzen werden verschiedene Strategien verfolgt. Bereits seit vielen Jahren werden Stoffsammlungen angelegt und nach neuen Wirkstoffen gescreent. Diese Stoffsammlungen beinhalten zum einen Naturstoffe, die aus Pilzen, Schwämmen und Pflanzen isoliert worden sind und zum anderen chemisch synthetisierte Stoffe (Newman & Cragg, 2007).

Seit der Sequenzierung des ersten Bakteriengenoms von *Haemophilus influenzae* im Jahr 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), folgten sehr viele weitere. Durch die Veröffentlichung der Genomsequenzen wird ein sehr großer Einblick in die genetische Welt der Bakterien ermöglicht, die zur Identifizierung neuer zellulärer Zielstrukturen genutzt werden kann. *In*

*silico* werden potentielle zelluläre Zielstrukturen ermittelt, deren Funktion durch Wirkstoffe inhibiert werden kann. Anschließend werden Wirkstoffe aus Stoffbibliotheken ausgewählt, die an diese Zielstruktur angreifen können. Allerdings konnte mit Hilfe dieser Strategie bisher noch kein neuer Wirkstoff in den Markt eingeführt werden (Mills, 2006; Coates & Hu, 2007), so dass diese genombasierte Methode kaum noch verfolgt wird. Stattdessen wird wieder großen Wert auf das Anlegen und Screening von Naturstoffbanken gelegt.

Diese Strategie wird durch das Anlegen von Genbanken nicht-kultivierbarer Mikroorganismen unterstützt. Die meisten Bakterien, die z. B. im Boden oder in Tiefseegewässern vorkommen, sind mit den heutigen Kultivierungsmethoden nicht erfassbar (Amann *et al.*, 1995; Rondon *et al.*, 1999). Da diese ebenfalls ein enormes Potential an neuartigen Substanzen bergen (Daniel, 2004), werden Genbanken von nicht-kultivierbaren Bakterien angelegt und nach antimikrobieller Aktivität gescreent. Dabei wird DNA, beispielsweise aus dem Erdboden oder aus marinen Gewässern, in Expressionsvektoren kloniert und in kultivierbaren Wirtssystemen, wie z. B. *Streptomyces spp.*, exprimiert und nach antibakterieller Aktivität gescreent (Rondon *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieser Methode konnten beispielsweise die antibakteriell wirkenden Substanzen Turbomycin A und Turbomycin B identifiziert werden (Gillespie *et al.*, 2002).

Lytische Bakteriophagen und ihre Produkte können einen weiteren Ansatz darstellen, neuartige antibakterielle Substanzen zu identifizieren, da sie die bakterielle Zellwand perforieren und dadurch lysieren (Borysowski *et al.*, 2006). Bakteriophagen werden in einigen osteuropäischen Ländern sowie in der früheren Sowjetunion eingesetzt, um Patienten mit Infektionskrankheiten zu behandeln (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Zudem kommen Bakteriophagen in der Geflügel- und Rinderzucht (Huff *et al.*, 2003; Doyle & Erickson, 2006; Sheng *et al.*, 2006), in der Aquakultur (Nakai & Park, 2002) und in Abwasserkläranlagen (Withey *et al.*, 2005) zum Einsatz.

Auch die von Phagen produzierten Phagenlysine können als antimikrobielle Wirkstoffe eingesetzt werden. Bei Phagenlysinen, die in der späten viralen Infektionsphase gebildet werden, handelt es sich um Zellwandhydrolasen. Durch die exogene Zugabe von rekombinanten Lysinen werden vor allem grampositive Bakterien lysiert (Borysowski *et al.*, 2006).

### **1.3 Tetramsäurederivate und das neue Antibiotikum Vancoresmycin**

#### **1.3.1 Tetramsäurederivate**

Tetramsäuren sind seit dem frühen zwanzigsten Jahrhundert bekannt. Sie besitzen ein 2,4-Pyrrolidindion-Grundgerüst (Abb. 1. 4), das vielfältig modifiziert in Naturstoffen auftritt. Sie konnten aus Pilzen, Myxomyceten, marinen Schwämmen und verschiedenen

Mikroorganismen isoliert werden. Viele dieser Naturstoffe zeigen ein interessantes Wirkungsspektrum, das von antimikrobieller, antiviraler bis hin zu antiulcerativer Aktivität reicht. Andere Vertreter wiederum sind für die Pigmentierung von Schwämmen und Schimmelpilzen verantwortlich (Royles, 1995). Die meisten isolierten Tetramsäurederivate besitzen an der 3 Position des 2,4-Pyrrolidindions einen substituierten Alkylrest (Abb. 1.4). Bekannte Tetramsäurederivate sind beispielsweise Reutericyclin (Abb. 1. 5) (Gänzle *et al.*, 2000), das aus *Lactobacillus reuteri* isoliert wurde, oder Raveninsäure (Abb. 1. 5), das aus dem Mycel von *Penicillium* sp. gewonnen wurde (Michael *et al.*, 2002). Beide Stoffe zeigen antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien.

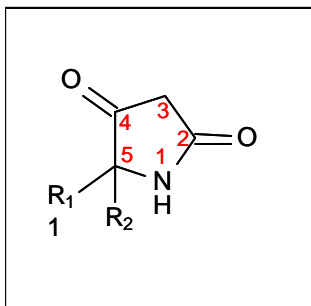


Abb. 1. 4: Strukturformel Tetramsäure (R = Rest)

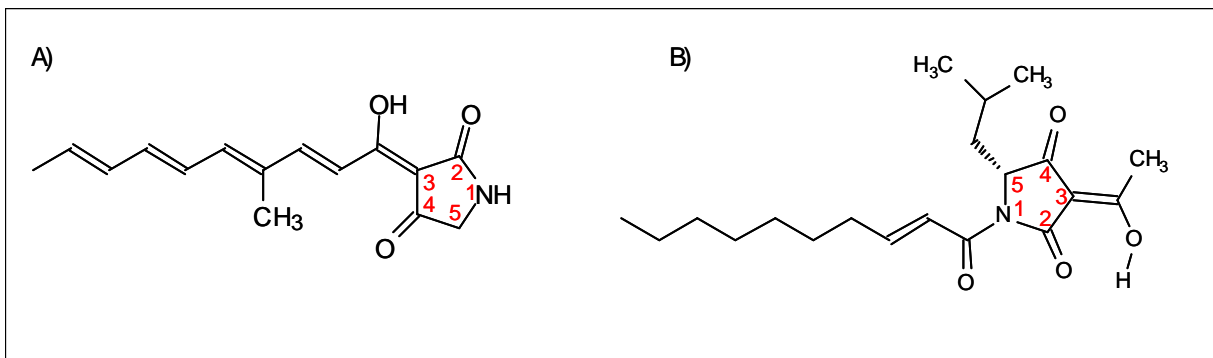
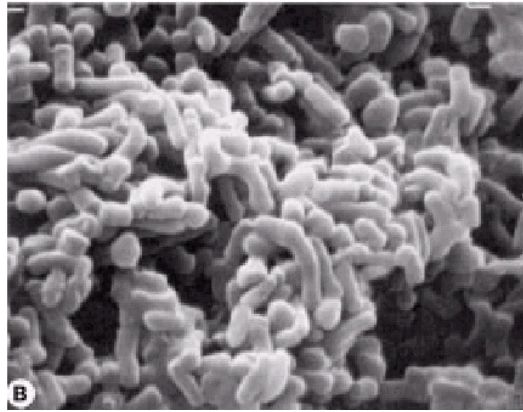


Abb. 1. 5: A) Strukturformel Raveninsäure; B) Strukturformel Reutericyclin (überwiegendes Tautomer)

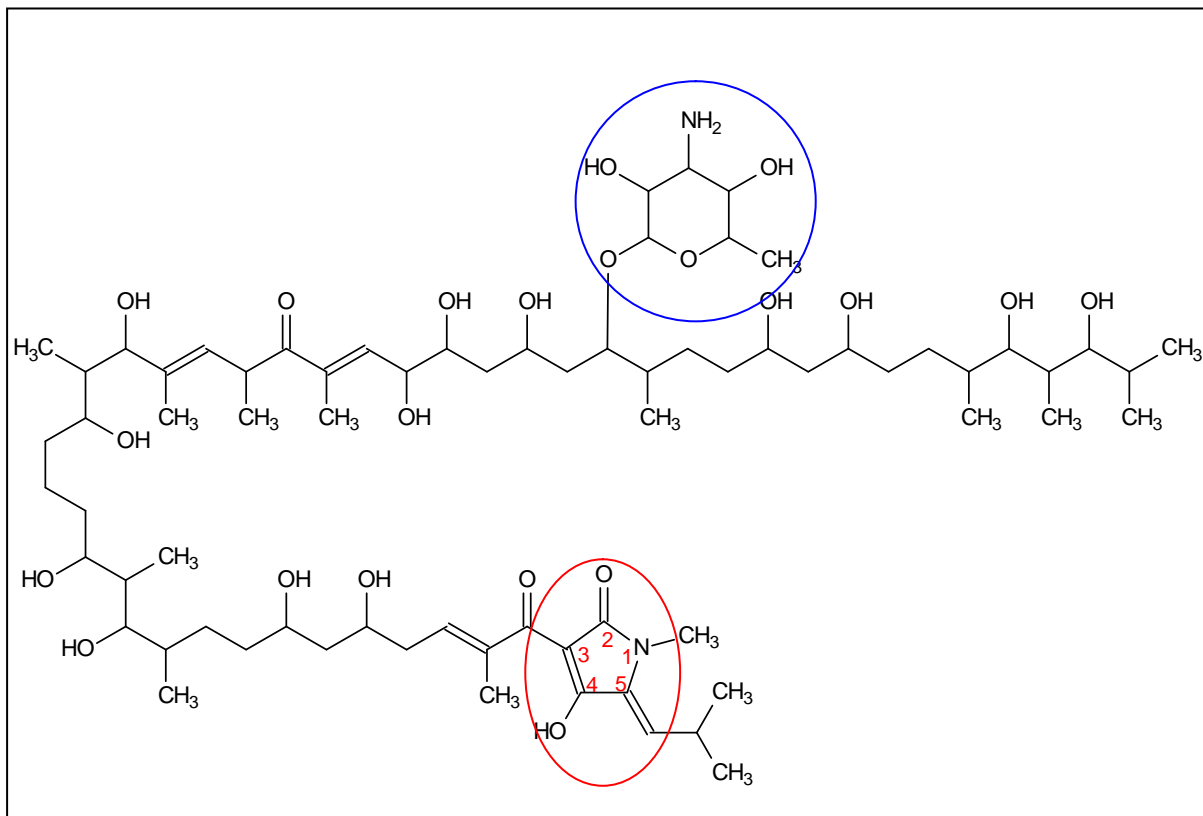
### 1.3.2 Isolation und Struktur von Vancoresmycin

Vancoresmycin wurde aus der Fermentationsbrühe des Aktinomyceten *Amycolatopsis vancoresmycina* (DSM Nr. 12216; ST 101170; DSM 44592<sup>T</sup>) isoliert. Dieser Stamm wurde aus einer Bodenprobe isoliert, die aus dem Nationalpark Borivli, Mumbai, Indien stammte (Abb. 1. 6). Die Gattung *Amycolatopsis* gehört zur Familie der *Pseudonocardiaceae*, deren Vertreter sich durch einen hohen GC-Gehalt auszeichnen. Zur Zeit sind 35 *Amycolatopsis*-Arten beschrieben, die vor allem durch die Produktion diverser Antibiotika bedeutend sind. So produziert zum Beispiel *Amycolatopsis mediterranei* verschiedene Rifamycine, die gegen Mycobakterien eingesetzt werden. Ein weiteres Beispiel stellt *Amycolatopsis orientalis* dar, das das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin produziert, das als Reserveantibiotikum gegen grampositive Kokken dient.



**Abb. 1. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Luftmycels von *Amycolatopsis vancoresmycina* (Wink et al., 2003)**

Vancoresmycin ist ein komplexes Molekül ( $C_{71}H_{126}N_2O_{21}$ ) mit einem Molekulargewicht von 1343,8 g/mol (Abb. 1. 7). Es handelt sich dabei um ein Tetransäurederivat, an dessen Position 3 eine hoch oxygenierte Acylkette substituiert ist. Die Seitenkette wiederum ist mit einem Aminosucker substituiert.



**Abb. 1. 7: Strukturformel Vancoresmycin**

Vancoresmycin besitzt die Strukturformel  $C_{71}H_{126}N_2O_{21}$  und hat ein Molekulargewicht von 1343,8 g/mol. Der Aminosuckerrest ist blau markiert, der Tetransäurerest rot.

### 1.3.3 Wirkungsspektrum von Vancoresmycin

Vancoresmycin besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien, jedoch nicht gegen gramnegative Bakterien und gegen Pilze. Es zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es das Wachstum vancomycin- und teicoplaninresistenter Stämme inhibiert (Hopmann *et al.* 2002).

## 1.4 ABC-Transporter

ABC-Transporter (ATP Binding Cassette, ABC) sind ubiquitär vorkommende Transmembranproteine, die einen aktiven Substrataustausch durch Membranen ermöglichen. ABC-Transporter beziehen ihre Energie aus der ATP-Hydrolyse, weshalb sie den primären Transportern zugeordnet werden, im Gegensatz zu den sekundären Transportern, die ein Substrat mit Hilfe eines elektrochemischen Konzentrationsgefälles durch Membranen befördern. Es werden Export- und Importsysteme unterschieden. Der grundlegende Aufbau der ABC-Transporter besteht aus zwei ATP-bindenden Domänen (nucleotide binding domain, NBD) bzw. UE und zwei Permeasedomänen (transmembrane domain, TMD) bzw. UE.

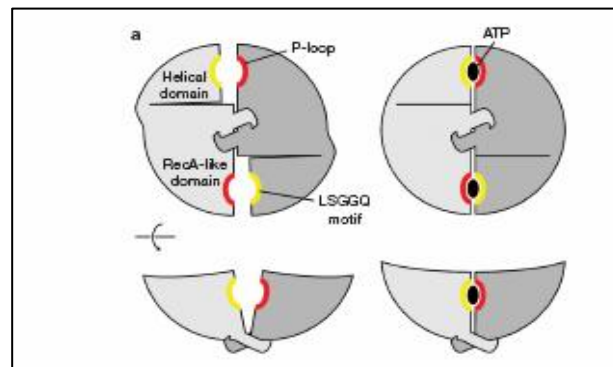
### 1.4.1 Struktureller Aufbau von ABC-Transportern

#### ATP-Bindeproteine

ATP-Bindeproteine werden als Motor eines Transporters bezeichnet. In einem funktionsfähigen ABC-Transporter gibt es zwei Untereinheiten (bzw. Domänen), die für die Energiebereitstellung durch ATP-Hydrolyse verantwortlich sind. ATP-Bindeproteine, die im Allgemeinen eine Länge von 200 bis 300 AS aufweisen, besitzen eine große Homologie zueinander. Ein ATP-Bindeprotein (bzw. NBD) setzt sich aus zwei (Sub) Domänen zusammen (Abb. 1. 8), eine helikale (Sub) Domäne, die aus drei bis vier  $\alpha$ -Helices besteht, und eine RecA ähnliche (Sub) Domäne, die aus zwei  $\beta$ -Faltblättern und sechs  $\alpha$ -Helices besteht (Davidson & Chen, 2004; Story & Steitz, 1992). Den ATP-Bindeproteinen (NBD) gemeinsam sind folgende konservierte Motive, die in die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse involviert sind:

Das WalkerA-Motiv (P-Loop, **G X X G X G K S T**; X entspricht einer beliebigen AS) (Walker *et al.*, 1982), das WalkerB-Motiv (**Y Y Y Y D**; Y entspricht einer beliebigen hydrophoben AS) (Walker *et al.*, 1982), das ABC-Signatur-Motiv (C-Loop, Linkerpeptid, **L S G G Q**), der A-Loop (Ambudkar *et al.*, 2006; aromatischer AS-Rest etwa 25 AS vor dem Walker-A Motiv), der D-Loop (**S A L D**), der H-Loop und Q-Loop (Davidson & Chen, 2004; Schmees *et al.*, 1999; Higgins, 1992). In einem funktionsfähigen ABC-Transporter sind die beiden ATP-Bindeprotein-UE (bzw. NBD) so angeordnet, dass ihre konservierten Sequenzmotive an

einer gemeinsamen Kontaktfläche miteinander interagieren können. Dadurch entstehen zwei ATP Bindestellen, an die zwei ATP so gebunden werden, dass sie als 'nucleotide sandwich dimer' vorliegen. Dabei liegt ein ATP zwischen dem WalkerA-Motiv (P-Loop, rot, Abb. 1.8), dem WalkerB-Motiv, dem A-, Q- und H-Loop der ersten UE (bzw. NBD) und dem ABC-Signatur-Motiv (LSGGQ-Motiv, gelb, Abb. 1.8), dem D-Loop der zweiten UE (bzw. NBD): Für das zweite ATP ist es umgekehrt (Ambudkar *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002). Nach der ATP-Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, wie es in der folgenden Darstellung (Abb. 1.8) vereinfacht dargestellt ist (Hollenstein *et al.*, 2007).



**Abb. 1. 8: Schematische Anordnung zweier NBD**

Beschreibung siehe Text (Abb. aus Hollenstein *et al.*, 2007).

## Permease

Permeasen sind integrale Transmembranproteine, die den eigentlichen Transportvorgang bewerkstelligen. Wie schon oben erwähnt (siehe 1.4), besitzen typische ABC-Transporter zwei Transmembrandomänen bzw. UE, die aus  $\alpha$ -Helices bestehen, die sich mehrere Male durch die Phospholipiddoppelschicht winden. Exporter besitzen in der Regel sechs Transmembranhelices pro UE (bzw. TMD), im Gegensatz zu Importern, deren Anzahl an Transmembranhelices pro UE (bzw. TMD) von fünf bis zehn variieren kann (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Higgins, 1992).

Da die meisten Permeasen eine große Substratspezifität aufweisen, zeichnen sie sich durch sehr unterschiedliche Primärsequenzen aus. Sequenzähnlichkeiten sind vorhanden, wenn ähnliche Substrate in die gleiche Richtung transportiert werden (Dawson *et al.*, 2007).

## Substratbindeprotein

Substratbindeproteine (SBP) und substratbindende Domänen (SBD) sind für ABC-Importer charakteristisch und werden deshalb in Kapitel 1.4.3 beschrieben.

## Akzessorische Domänen

Neben dem eben beschriebenen prinzipiellen Aufbau der ABC-Transporter, wurden in einigen Transportern akzessorische Domänen nachgewiesen, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Diese werden in vier Gruppen unterteilt: 1) extrazytoplasmatische Domänen, 2) membraneingebettete Domänen, 3) zytosolische regulatorische Domänen und 4) zytosolische katalytische Domänen (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

Zu den extrazytoplasmatischen Domänen zählen neben den in Kapitel 1.4.3 beschriebenen SBP (SBD), die 'large extracytoplasmatic' Domänen (ECD), und die 'extracellular N-terminal' Domänen, deren beider Funktionen bisher nur unzulänglich bekannt sind.

Die genaue Funktion membraneingebetteter Domänen, die sich zusätzlich neben der eigentlichen Transmembrandomäne in der Membran befinden, ist in den meisten Fällen nicht aufgeklärt (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

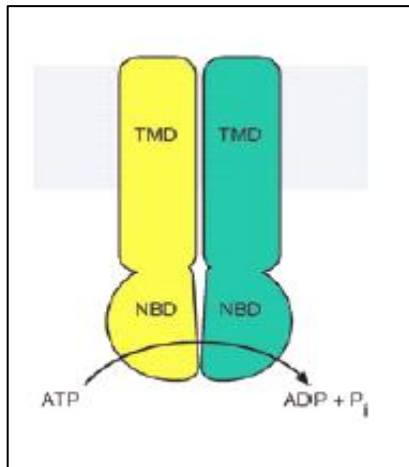
Mit Hilfe von zytosolischen, regulatorischen Domänen kann die Aktivität von ABC-Transportern reguliert werden. Ein Beispiel dafür ist die C-terminale Domäne der NBD MalK in den jeweiligen Maltosetransportern von *E. coli* und *Salmonella typhimurium*.

Zytosolische katalytische Domänen verfügen über eine enzymatische Aktivität. Wenn ABC-Transporter in den Export von Bacteriocinen, Haemolysinen, CSP oder nicht proteinösen Material involviert sind, so sind sie neben dem Export auch für die Entfernung von Leaderpeptiden verantwortlich. Derartige Peptide werden ribosomal synthetisiert, wobei sie mit einem N-terminalen Linker aus 15-30 AS versehen werden. Die Konsensussequenz **L S X X E L X X I X G G** (X entspricht einer beliebigen AS) wird nach den beiden konservierten Glycinresten abgespalten, so dass ein prozessiertes Peptid die Zelle verlässt (Håvarstein *et al.*, 1994). Für diesen Vorgang ist eine Peptidasedomäne verantwortlich, die mit dem entsprechenden ABC-Transporter assoziiert ist (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). In *S. pneumoniae* stellt der ABC-Transporter ComAB, der das Genprodukt ComC, das CSP, prozessiert, ein Beispiel dar (siehe 1.1.3).

### 1.4.2 ABC-Exporter

ABC-Exporter, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorkommen, können unter anderem Signalmoleküle, Virulenzfaktoren und Antibiotika nach draußen transportieren (Davidson & Chen, 2004). In Prokaryoten wird eine TMD meist zusammen mit einer NBD synthetisiert, so dass zwei dieser Halbtransporter einen funktionsfähigen Transporter bilden (Abb. 1. 9). In Eukaryoten werden alle vier Domänen in einer Polypeptidkette synthetisiert (Dawson *et al.*, 2007; Davidson & Chen, 2004; Saurin *et al.*, 1999). Eine TMD setzt sich in der Regel aus sechs Transmembranhelices zusammen, so dass ein vollständiger Exporter,

bestehend aus zwei TMD, aus zwölf Transmembranhelices existiert (Higgins, 1992; Fath & Kolter, 1993; Dawson *et al.*, 2007)



**Abb. 1. 9: Schematische Anordnung eines ABC-Exporters**

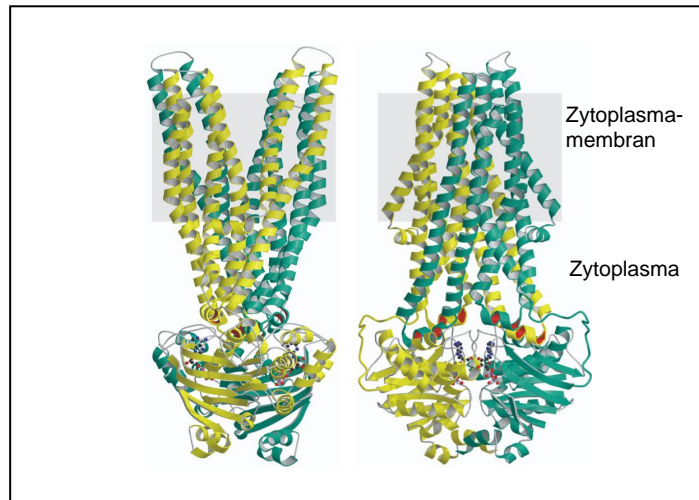
Bakterielle Exporter setzen sich in der Regel aus zwei Halbtransportern zusammen (gelb und grün), wobei eine TMD mit einer NBD synthetisiert wird. Die Zytosolmembran ist grau schattiert. (Abb. aus Dawson *et al.*, 2007).

In Prokaryoten und Eukaryoten sind viele unterschiedliche Exportsysteme beschrieben, die zum einen spezifisch ein Substrat und zum anderen verschiedene Substrate transportieren können. Der Multidrug ABC-Transporter 'Human Multidrug resistance P-glycoprotein MDR1' ist beispielsweise in der Lage, in humanen Krebszellen verschiedene chemotherapeutische Medikamente zu exportieren, so dass Krebstherapien erschwert werden (Higgins, 1993; Chang, 2007). Dazu homolog sind unter anderem die bakteriellen Multidrugtransporter LmrA aus *Lactococcus lactis* (van Veen *et al.*, 1996) und Sav1866 aus *Staphylococcus aureus* (Dawson & Locher, 2006; Dawson & Locher, 2007).

Die Substrataufnahme ist bei ABC-Exportern nicht genau geklärt. Es gibt keine SBP bzw. SBD, die das Substrat an die Permease weiter leiten, sondern die Substrate befinden sich im Zytosol bzw. an der Innenseite der Zytosolmembran, von wo aus sie transportiert werden (Pleban *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2007).

Durch die Röntgenstrukturanalyse des Exporters Sav1866 aus *Staphylococcus aureus* (Abb. 1. 10) konnte der molekulare Transportmechanismus weiter aufgeklärt werden (Dawson & Locher, 2006). Die Abb. 1. 10 zeigt eine nach außen gerichtete Konformation, wobei die zwei ATP-bindenden Domänen in nahem Kontakt stehen und die Transmembrandomänen eine zentrale Höhle bilden, durch die das Substrat transportiert wird. Auf der linken Hälfte der Abb. 1. 10 werden besonders die beiden in der Membran verankerten Flügel deutlich. Auf der rechten Hälfte der Abbildung wird eine um 90° verschobene Anordnung des Transporters gezeigt (Dawson & Locher, 2006). Durch diese Kristallisation konnte außerdem gezeigt werden, dass beide Untereinheiten verdreht sind und sich gegenseitig umfassen, wodurch die Untereinheiten miteinander interagieren können.



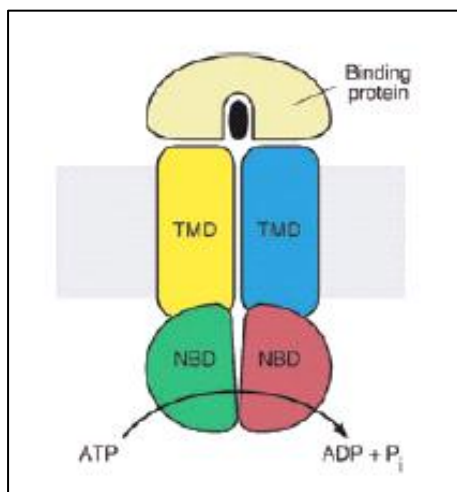


**Abb. 1. 10: Röntgenstrukturanalyse des ABC-Exporters SAV1866 aus *Staphylococcus aureus***

Ein Halbtransporter bestehend aus einer TMD und einer NBD ist grün dargestellt, der zweite gelb. (links Vorderansicht, rechts um 90 °C verdreht; nach Dawson & Locher, 2006)

### 1.4.3 ABC-Importer

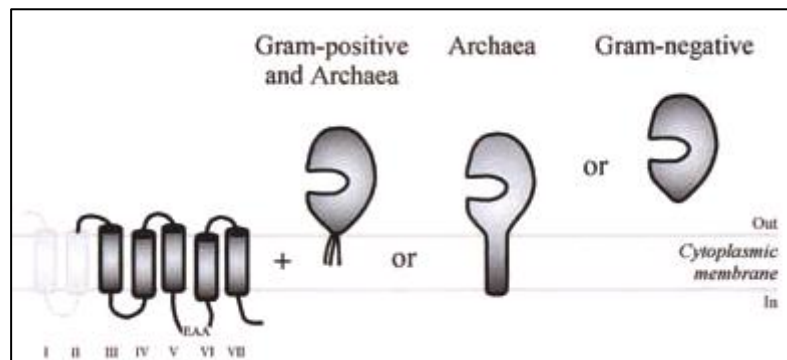
Prokaryotische ABC-Importer dienen zur Aufnahme essentieller Nährstoffe wie z. B. Zucker, Aminosäuren, Peptide, Vitamine und anorganische Ionen aus dem umgebenden Medium. Die UE werden im Allgemeinen getrennt voneinander exprimiert. Abhängig vom Molekulargewicht und der chemischen Struktur des zu transportierenden Substrates, variiert die Anzahl der Transmembranhelices in einer Permeaseuntereinheit (bzw. TMD) von zehn bis 20 Transmembranhelices (Higgins, 1992; Davidson & Chen, 2004; Hollenstein *et al.*, 2007). ABC-Importer besitzen in der Regel ein SBP bzw. eine SBD, das die Verbindung zwischen Substrat und Transporter ermöglicht. In Abb. 1. 11 ist eine schematische Anordnung der fünf Untereinheiten eines Importers wiedergegeben (Dawson *et al.*, 2007).



**Abb. 1. 11: Schematische Anordnung eines ABC-Importers**

Das SBP (beige), das sich an der Außenseite der Zytoplasmamembran (grau) befindet, stellt den Kontakt zwischen Substrat (schwarz) und den beiden Permease-UE (hier als TMD bezeichnet; gelb und blau) her. Die Energetisierung wird durch die beiden ATP-Bindeproteine (hier als NBD bezeichnet; grün und rot) gewährleistet (Abb. aus Dawson *et al.*, 2007).

Die SBP (bzw. SBD) besitzen eine sehr hohe Affinität für die zu transportierenden Substrate (Chen *et al.*, 2001; Davidson, 2002). Sie wurden zuerst im periplasmatischen Raum gramnegativer Bakterien identifiziert (Abb. 1. 12; Neu & Heppel, 1965; van der Heide und Poolman, 2002). In grampositiven Bakterien und in manchen Archaea sind die SBP an die äußere Oberfläche der Zellmembran durch einen N-terminalen Lipidanker gebunden (Abb. 1. 12; Gilson *et al.*, 1988; Sutcliffe & Russel, 1995, van der Heide & Pollman, 2002). In Archaea gibt es auch SBD, die an eine Transmembrandomäne fusioniert sind wie es z. B. für den Glucosetransporter Glc aus *Sulfolobus solfataricus* beschrieben wurde (Albers *et al.*, 1999).



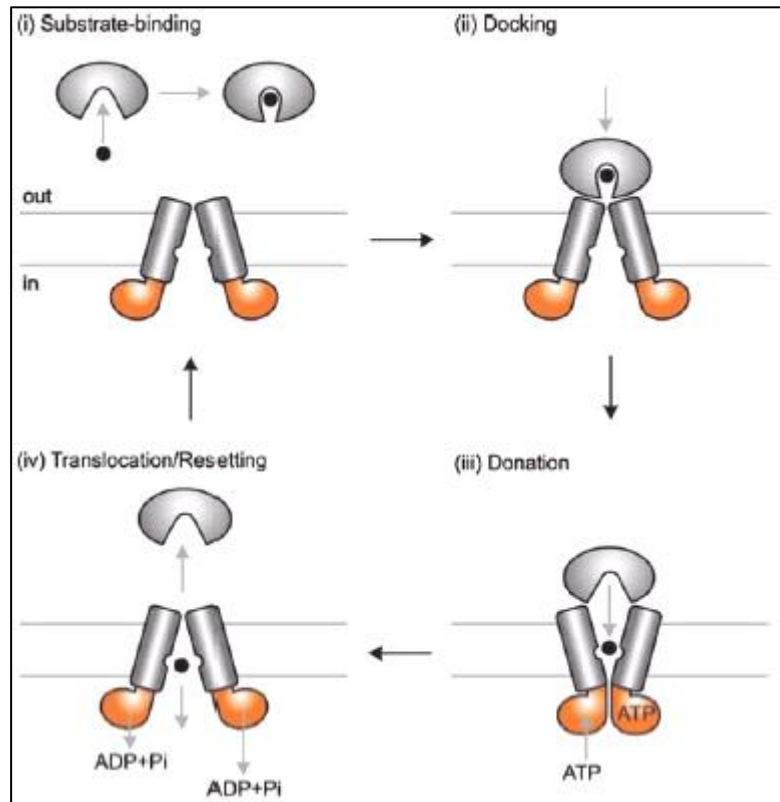
**Abb. 1. 12: Lokalisierung von SBP und SBD**

Beschreibung siehe Text (Abb. aus van der Heide & Poolman, 2002).

Die Anzahl der SBP (bzw. SBD) pro ABC-Transporter kann variieren. Es gibt ABC-Transporter, die zwei SBD besitzen, die jeweils am C-Terminus der beiden TMD bzw. UE fusioniert sind, wie z. B. bei dem Glycin Betain Transporter (OpuA) aus *Lactococcus lactis* (Obis *et al.*, 1999; van der Heide & Poolman, 2000). Für den Transporter GlnPQ aus *Lactococcus lactis* wurden vier SBD, die als Tandem an je eine TMD fusioniert waren, nachgewiesen (Schuurman-Wolters & Poolman, 2005).

Obwohl die Primärsequenzen und die Größe der SBP und der SBD sehr variabel sein können, gibt es im tertiären Aufbau kaum Unterschiede (Quiocho & Ledvina, 1996). Die meisten SBP (bzw. SBD) bestehen aus zwei verschiedenen, globulären (Sub) Domänen, der C- und der N-Domäne, die durch ein elastisches Gelenk miteinander verbunden sind (Quiocho & Ledvina, 1996; Lanfermeijer *et al.*, 2000). In dem dadurch gebildeten Hohlraum wird das Substrat gebunden (Abb. 1. 13), wobei sich die zwei (Sub) Domänen weiter um das Substrat schließen (Quiocho & Ledvina, 1996; van der Heide & Poolman, 2002). In diesem geschlossenen Zustand interagiert das SBP (SBD) mit den in der Zytoplasmamembran lokalisierten Transmembranproteinen. Es wird davon ausgegangen, dass das substratgebundene SBP (SBD) über die Transmembranuntereinheiten ein Signal an die ATP-Bindeproteine vermitteln, die daraufhin jeweils ein ATP binden und hydrolysieren.

Dadurch wird die Translokationspore geöffnet und das Substrat löst sich von dem SBP (SBD) und wird in das Innere transportiert (Davidson *et al.*, 1992; van der Heide & Poolman, 2002; Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).



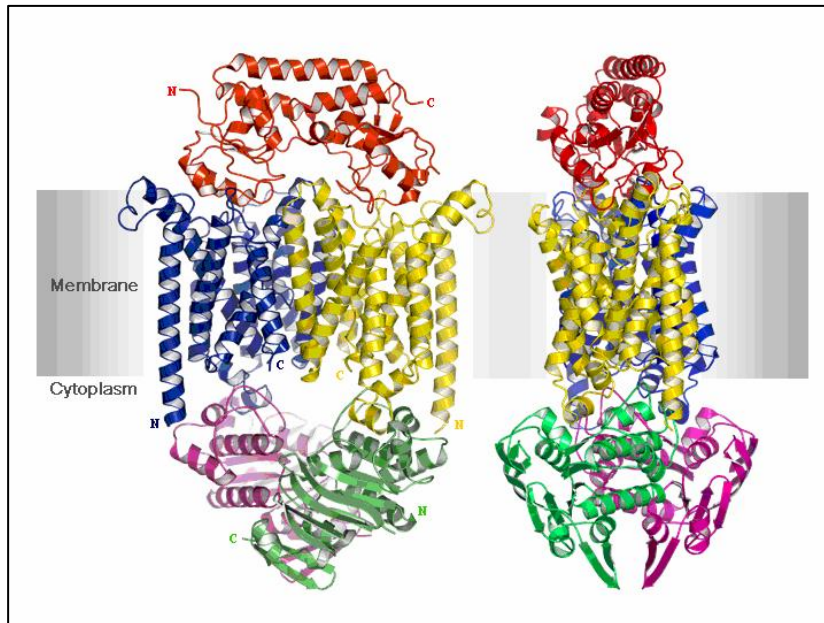
**Abb. 1. 13: Translokationsmechanismus SBP-abhängiger ABC-Transporter**

Beschreibung siehe Text (Abb. aus Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

Für SBP-abhängige Transportsysteme wurde ein konserviertes Motiv beschrieben (Dassa & Hofnung, 1985; Saurin & Dassa, 1994), das in der Regel im cytoplasmatischen Loop zwischen TMH 5 und TMH 6 zu finden ist. Das EAA-Motiv (**E A A X X X G X X X X X X X X X I X L P**, wobei X eine beliebige AS darstellt) ist etwa 90 AS vom C-Terminus entfernt.

Es liegen für verschiedene ABC-Importer Kristallstrukturen vor, wie z. B. für den Vitamin B12-Importer BtuCD-BtuF aus *E. coli* (Locher *et al.*, 2002; Hvorup *et al.*, 2007), den Metallchelatorimporter HI1470/71 aus *Haemophilus influenzae* (Pinkett *et al.*, 2007) und einem Molybdätrimporter aus *Archaeoglobus fulgidus* (Hollenstein *et al.*, 2007). Zur Veranschaulichung eines Importers wird eine kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des Vitamin B12-Importers BtuCD-BtuF aus *E. coli* gezeigt (Abb. 1. 14; Hvorup *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um eine substratfreie, offene Konformation: Das periplasmatische SBP BtuF (rot), das das Substrat Vitamin B12 fasst und es an die beiden Permeaseuntereinheiten BtuC (gelb bzw. blau) weitergibt (Cadieux *et al.*, 2002), ist an diese assoziiert. Der

Translokationsprozess wird durch die beiden ATP-Bindeproteine BtuD (grün und violett) energetisiert.



**Abb. 1. 14: Röntgenstrukturanalyse des Vitamin B12-Importers BtuCD-BtuF**

Das SBP BtuF (rot) ist an den Transporter assoziiert. Die Permeaseuntereinheiten sind blau und gelb dargestellt, die ATP-Bindeproteine grün und violett. Dargestellt ist eine substratfreie, offene Konformation. (links: Vorderansicht, rechts: um 90° gedreht, Hvorup *et al.*, 2007).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, potentielle Resistenzdeterminanten in isolierten vancoresmycinresistenten Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae* R6 zu identifizieren und zu analysieren. Dazu sollten zuerst vancoresmycinresistente Mutanten isoliert und phänotypisch charakterisiert werden.

Mit Hilfe von Genbanken und mikroarraybasierten Transkriptomstudien sollten mögliche genetische Determinanten ausgewählter Mutanten für die Resistenz von Vancoresmycin identifiziert werden. Die Funktion potentieller genetischer Resistenzdeterminanten sollte experimentell abgeklärt werden und durch bioinformatische Recherchen unterstützt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits

In den folgenden Tabellen 2.1 bis 2.4 werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Enzyme, Chemikalien und Kits sowie deren Hersteller angegeben.

**Tab. 2. 1: Verwendete Geräte und deren Bezugsquellen**

Gerät	Firma
Biofuge Stratos	Hereaus Instruments Sepatech, Hanau
CCD-1300B-Kamera	VDS Vosskühler GmbH, Osnabrück
Geldokumentationsanlage	Digit-Store duo-Systems, INTAS Göttingen
GenePulser™	Bio-Rad Laboratories, München
GenPure-Wasseraufbereitungsanlage	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert
Hybridisierungsmaschine HS400	Tecan, Crailsheim
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann Instruments, Kalifornien, USA
Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5B plus	DuPont Company, Wilmington, Delaware, USA
LightCycler 2,0 mit LC Carousel Centrifuge 2.0	Roche, Mannheim
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600 mit CDD-1300B-Kamera	Nikon GmbH, Düsseldorf
Makrostand M-CXL-48-50	Synoptics Ltd, Syncroscopy, Cambridge, England
Milliporewasseranlage Milli-Q	Millipore, Billerica, USA
Minitischzentrifuge Spectrafuge Mini	Labnet International Inc., Woodbridge, USA
Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Nephelometer	Diffusion Systems, London, England
NexterionR Slides E	Schott AG, Mainz
Pins für Spotter	SMP3-Pins von Telechem, Sunnyvale, USA
ScanArrayR4000 Microarray Analysis System	PerkinElmer, Wellesley, USA
Schwenkwasserbad	UNITHERM HB auf UNITWIST, UniEquip, Martinsried
Speed-Vac mit Kühlfalle	SVC 100, Savant, Farmingdale, NY, Refrigerated Condensation Trap, RT100, Savant
SpotArray™24 Microarray Spotting System	PerkinElmer, Wellesley, USA
T1 Thermocycler, T-Gradientcycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	ONCORR, AppligeneR, Heidelberg
Ultrospec III UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Uvikon 922 Spectrophotometer	Kontron Instruments, Groß-Zimmern
3D-Wipptisch (Rocky 3D)	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Vakuum Exsikkator	Kartell®, Noviglio, Italien

**Tab. 2. 2: Verwendete Standards und Kits und deren Bezugsquellen**

Standards und Kits	Firma
1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche, Mannheim
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
CopyControl™ Fosmid Library Production Kit	EPICENTRE Biotechnologies, Madison, USA
GeneClean®-Kit	Qbiogene, Heidelberg
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Ready load 1 kb DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Jet Quick Purification Spin Kit	Genomed, Löhne
Labelstar™-Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond® PC100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
QIA-prep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
RNeasy® Midi/Mini Kit	Qiagen, Hilden
SYBR® Premix Ex Taq™	Takara Bio Inc, Otsu, Japan

**Tab. 2. 3: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle**

Chemikalien	Firma
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bacitracin	Sigma-Aldrich Co., München
Chloramphenicol	Roche, Mannheim
Cy3-/Cy5-dCTP	PerkinElmer, Wellesley, USA
defibriniertes Schafsblut	Oxoid GmbH, Wesel
DEPC-H <sub>2</sub> O	Ambion, Woodward Austin, USA
dNTP-Mix (10mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycogen	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Kanamycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phase-Lock-Gel™-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Seakem LE-Agarose	FMC Biozym, Rockland, ME, USA
Sea Plaque® GTG® Low-melting Agarose	FMC Biozym, Rockland, ME, USA
Spectinomycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptomycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetracyclin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Vancoresmycin	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main (Geschenk)

**Tab. 2. 4: Verwendete Enzyme und deren Bezugsquellen**

Enzyme	Firma
Alkalische Shrimp Phosphatase	Roche, Mannheim
DNaseI, RNase-frei	New England Biolabs, Ipswich, USA
Red Goldstar™ DNA Polymerase	Eurogentec, Seraing, Belgien
Herculase® Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase	Bio-Rad Laboratories, München,
Proteinase K	Applichem GmbH, Darmstadt
RNase A	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
T4 RNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Tobacco acid pyrophosphatase (TAP)	EPICENTRE Biotechnologies, Madison, USA

Gebrauchskemikalien und allgemeiner Laborbedarf, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Eppendorf, Hamburg, C. Roth GmbH, Karlsruhe, Fluka AG, Neu-Ulm, E. Merck AG, Darmstadt, Serva Feinchemie GmbH, Heidelberg und Sigma Chemie GmbH, München bezogen. Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Ipswich, USA und Roche, Mannheim erworben.

## 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1 Bakterienstämme

In den nachfolgenden Tabellen werden die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme (Tab. 2. 5) und *S. pneumoniae* Stämme (Tab. 2. 6) aufgelistet.

**Tab. 2. 5: *E. coli* Stämme**

Stämme	Merkmale	Verwendung	Referenz
DH5α	$\Delta(lac)U169$ , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , $\Phi80\Delta(lacZ)M15$ , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i>	Genbank mit Vektor pWSK129, Klonierungsstamm	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
CAI <sup>q1</sup>	[ <i>lac pro</i> ] $\Delta thi$ , <i>cap</i> , <i>cya</i> , <i>strA</i> , <i>recA</i> , F' <i>lacI<sup>q1</sup></i> , <i>lac<sup>+</sup></i> , <i>pro<sup>+</sup></i>	Isolierung des Vektors pUH89	Henrich <i>et al.</i> , 1983
EPI300™	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\Phi80\Delta(lacZ)M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara, leu)7697$ , <i>galK</i> , $\lambda^-$ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> , <i>trfA</i> , <i>tonA</i> , T1 <sup>R</sup>	Fosmidgenbank mit Vektor pCC1Fos™	EPICENTRE, (Madison, USA)
ER1562	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>mcrA1272::Tn10</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrB1</i>	Genbank mit Vektor pUH89	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Tab. 2. 6: *S. pneumoniae* Stämme

Stämme	Merkmale	Referenz
R6	R36A-Derivat, kapselfrei	Avery <i>et al.</i> , 1944 Ottolenghi & Hotchkiss, 1962
amiA9	R36A-Derivat, Str <sup>R</sup> , Ami <sup>R</sup>	Sicard, 1964 Salles <i>et al.</i> , 1992
aR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
bR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
cR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
dR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
eR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
fR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
gR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup> <i>spr0813</i> (Nonsense-Mutation in Codon 581)	diese Arbeit
hR6	R6-Derivat, Labormutante: Vrm <sup>R</sup>	diese Arbeit
R6- <i>rpsL</i> ::IS 10-R	R6-Derivat: <i>rpsL</i> ::IS 10-R	diese Arbeit
R6- <i>dexS</i> ::IS 10-R_A	R6-Derivat: <i>dexS</i> ::IS 10-R (nach 289 bp)	diese Arbeit
R6- <i>dexS</i> ::IS 10-R_B	R6-Derivat: <i>dexS</i> ::IS 10-R (nach 27 bp)	diese Arbeit
R6_Str <sup>R</sup>	R6-Derivat: <i>rpsL</i> (L56T)	diese Arbeit
R6Δ <i>dexS_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	R6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>dexS</i> :: <i>aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	diese Arbeit
R6Δ <i>dexS</i>	R6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>dexS</i>	diese Arbeit
R6ΔABC	R6-Derivat: Δ( <i>orf1-spr0812-spr0813</i> ):: <i>aphIII</i>	diese Arbeit
R6-P <sub>abc</sub>	R6-Derivat: <i>bgaA</i> :: <i>tetM-P<sub>abc</sub>-lacZ</i>	diese Arbeit
RP204	R6-Derivat: <i>bgaA</i> :: <i>tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007a
RP200	R6-Derivat: <i>bgaA</i> :: <i>tetM-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007a
aR6_Str <sup>R</sup>	aR6-Derivat: <i>rpsL</i> (L56T)	diese Arbeit
aR6Δ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	aR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i> :: <i>aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	diese Arbeit
aR6Δ <i>copY</i>	aR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i>	diese Arbeit
aR6Δ <i>cyl</i>	aR6-Derivat: Δ( <i>spr1763</i> '-' <i>spr1775</i> ):: <i>aad9</i>	diese Arbeit
eR6_Str <sup>R</sup>	eR6-Derivat: <i>rpsL</i> (L56T)	diese Arbeit
eR6Δ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	eR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i> :: <i>aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	diese Arbeit
eR6Δ <i>copY</i>	eR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i>	diese Arbeit
eR6Δ <i>cyl</i>	eR6-Derivat: Δ( <i>spr1763</i> '-' <i>spr1775</i> ):: <i>aad9</i>	diese Arbeit
fR6_Str <sup>R</sup>	fR6-Derivat: <i>rpsL</i> (L56T)	diese Arbeit
fR6Δ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	fR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i> :: <i>aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	diese Arbeit
fR6Δ <i>copY</i>	fR6-Derivat: <i>rpsL</i> , Δ <i>copY</i>	diese Arbeit
fR6Δ <i>cyl</i>	fR6-Derivat: Δ( <i>spr1763</i> '-' <i>spr1775</i> ):: <i>aad9</i>	diese Arbeit
gR6ΔABC	gR6-Derivat: Δ( <i>orf1-spr0812-spr0813</i> ):: <i>aphIII</i>	diese Arbeit
gR6-P <sub>abc</sub>	gR6-Derivat: <i>bgaA</i> :: <i>tetM-P<sub>abc</sub>-lacZ</i>	diese Arbeit
gTR	R6-Derivat: Transformante: Vrm <sup>R</sup> ; <i>spr0813</i> : (Nonsense-Mutation in Codon 581)	diese Arbeit
gTRΔABC	gR6TR-Derivat: Δ( <i>orf1-spr0812-spr0813</i> ):: <i>aphIII</i>	diese Arbeit
gTR-P <sub>abc</sub>	gTR-Derivat: <i>bgaA</i> :: <i>tetM-P<sub>abc</sub>-lacZ</i>	diese Arbeit



### 2.2.2 Plasmide

In der nächsten Tabelle (Tab. 2. 7) werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Die Vektoren pCC1FOS<sup>TM</sup>, pUH89 und pWSK129 wurden für die Erstellung von Genbanken in *E. coli* verwendet, pPP2 für Promotoraktivitätsstudien in *S. pneumoniae*. Der Vektor pUC19, der *Sma*I-restringiert und dephosphoryliert kommerziell erworben wurde, wurde für allgemeine Klonierungen in *E. coli* eingesetzt. Der Vektor pBR322 wurde kommerziell erworben (Roche, Mannheim) und diente als Konzentrationsmarker zur DNA-Konzentrationsbestimmung (siehe 2.6.8).

**Tab. 2. 7: Vektoren/Plasmide**

Vektor/Plasmid	Replikon	Merkmale	Selektion	Referenz
pBR322	ColE1	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>		Bolivar <i>et al.</i> 1977
pCC1FOS <sup>TM</sup>	f1, oriV	<i>lacZ</i> , Cam <sup>R</sup>	Cam (12,5 µg/ml, <i>E. coli</i> )	EPICENTRE, Madison, USA; Wild <i>et al.</i> , 2002
pdel17	ColE1	pUC19 Derivat, <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Amp (100 µg/ml, <i>E. coli</i> ) Spc (80 µg/ml, <i>S. pneumoniae</i> )	Volz, Dissertation, 2008
pPP2	ColE1	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , ' <i>lacZ</i>	Amp (100 µg/ml, <i>E. coli</i> ), Tet (3 µg/ml)	Halfmann <i>et al.</i> , 2007a
pPP-P <sub>abc</sub>	ColE1	pPP2 Derivat: P <sub>abc</sub> :: <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Amp (100 µg/ml, <i>E. coli</i> ), Tet (3 µg/ml, <i>S. pneumoniae</i> )	diese Arbeit
pUC19	ColE1	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Amp (100 µg/ml, <i>E. coli</i> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUH89	ColE1	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> , Lysegen von φX174	Amp (200 µg/ml, <i>E. coli</i> )	Henrich & Schmidtberger, 1995
pWSK129	pSC101, f1	<i>lacZ</i> , Kan <sup>R</sup>	Kan (25 µg/ml, <i>E. coli</i> )	Wang & Kushner, 1991

### 2.2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2. 8) wurden von den Firmen Operon Biotechnologies GmbH, Köln und MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in TE-Puffer gelöst (100 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert. Davon wurden Gebrauchslösungen in einer Konzentration von 10 pmol/µl (Sequenzierungen und PCR) bzw. 1 pmol/µl (5'-RACE) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Die Schmelztemperatur T<sub>m</sub> [°C] der Oligonukleotide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m \text{ [}^\circ\text{C]} = 81,5 + 16,6 \times \log [\text{Na}^+] + \frac{41 \times (\text{nG} + \text{nC})}{N_{\text{PR}}} - \frac{500}{N_{\text{PR}}}$$

(T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur, [Na<sup>+</sup>] = Natriumkonzentration (standardmäßig 0,1 M), nG = Anzahl G, nC = Anzahl C, N<sub>PR</sub> = Länge des Primers)

Tab. 2. 8: Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [nt]	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz 5' → 3'
<b>Allgemeine Oligonukleotide (Resistenzkassetten, Plasmide, Kontrolle):</b>			
#2uni_fwd	32	67	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG
#2uni_rev	30	66	GTAGCTATTTAGGTGAGACTATAGAATAC
274-lacZ	21	72	GGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
amiA9_fwd1	31	67	GGCTCTAGGTCTTCAAAGATATCGACTTTGG
amiA9_rev1	32	68	AAACAGTGTGCGATTTCTTGACGGCTGTTAGCG
aphIII_fwd	25	61	ATGGCTAAAATGAGAATATCACCGG
aphIII_rev	30	56	CTAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATA
bgaA_rev_Kontr	26	65	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC
ctrl17_for	22	59	GTTCTCTGTCTAGAAATTTGGC
ctrl17_rev	21	59	AATTGGAGTTTCGTTACAGG
gpmB1	20	56	GACACCTATTTCTCTGATTG
gpmB4	22	61	GGTTCCAATAGTCATTCCATGG
janus_f	29	69	CCTATTCCAGAGGAAATGGATCGGATCCG
Janus_fwd2	30	66	AAGGCCGTTCTAAATACGGTACTAAACGTC
janus_r	27	69	GGGCCCTTTCTTATGCTTTTGGACG
Janus_rev2	30	67	TACCTTAGCAGGAGACATTCCTTCCGTATC
lacZ_fwd_Kontr	26	68	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
M13rev (-49)	24	63	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
M13uni (-21)	18	58	TGTA AACGACGGCCAGT
MCS_fwd_Kontr	21	61	GCGACATTCACGATTACTTGG
pbp2a_1U	26	66	CTAGGGATGAGGAGTTGTTCTCAAG
pbp2a_2268r	33	71	AGTTTCTCGAACCACAAACCGCACAAAGCTAGGC
RACE-PCR_5	18	58	GATATGCGGAATTCCTG
RTgyrAf	22	61	TATCACAGCAGTACGTGATGAG
RTgyrAr	22	61	GGATAGCGAGCATATTGAAACC
<b>IS10-R:</b>			
IS10_1rev	30	73	GACGGGTGGTGACAATGAGTCCGTGTCGAG
IS10_2fwd	30	69	CGTTGAGAAGCTGGGTTGGTACTGGTTAAG
IS10_3fwd	30	69	GCTTAACGTTGGCTTGCCACGCATTACTTG
IS10_4rev	31	70	TAGTAGGGTTGCAGCCACGAGTAAGTCTTCC
IS10_rev5	30	63	GACAAGATGTGTATCCACCTTAACCTAATG
IS10_fwd6	30	72	GGGAAGACTTACTCGTGGCTGCAACCCTAC
<b>Bereich spr0812 und spr0813:</b>			
ko-TR_aphIII_fwd	59	68	TATTATATTTTACTGGATGAATTGTTTTAGAAAAAGATA CCTCGACTTCAAATCGAGG
Proof1_Kanlink_rev	53	71	CCGGTGATATTCTCATTTTAGCCATGATGTTACTCCTT TGTTCTTTATGAGTC
Pspr0812_fwd1	36	64	GACGCATGCCTTATATTTTACAACCTTTAAAAATAGG <sup>1</sup>
Pspr0812_rev1	39	68	CGCGGATCCCTTTATGAGTCTAGTTTACATCAAAAAA AG <sup>2</sup>
RTspr0812_fwd5	19	58	AAGTCGTGGTCAGGTTTAC
RTspr0812_rev7	19	58	GCGGAAGCAAGATATTGTC
RTspr0813_fwd1	21	59	AAACCGCAAACCTACTATCC

Bezeichnung	Länge [nt]	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz 5' → 3'
RTspr0813_rev1	21	59	GACGACAAACATACCAAATCC
spr0812_fwd1	24	65	GTAAGGTTAGGTTATGGCAAGCGG
spr0812_fwd2	24	68	GGTGGTGACAGCTGAGAATCTGGG
spr0812_fwd3	27	71	GTTGGAGCGGGTATCGGTATTGGAGCC
spr0812_fwd4	29	67	CTCTTGAGCCAGTTTGCAAGTGACAAAGG
spr0812_rev1	27	65	CCTTGCTATTGGTCTCTTAACATATGGG
spr0812_rev2	28	63	CAGGTACAACAAGGTAATTGTAATCAGC
spr0812_rev3	27	65	GAAGAAGGTTGTTAAGGCTGTAAGAGG
spr0812_rev4	26	63	CAGTCAAGGTATCAGAGATTTCTTGG
spr0812_rev5	27	66	GCGGTGTCAGTTCCATTCAAGTAAACC
spr0812_rev6	24	65	GATTTACCAGAACCAGACTCACCC
spr0812_down3	28	66	TGCTTGTCTTGACGGATCGAAAGAGTAG
spr0812_down4	28	65	TTCTTTCCATCACGGCAGATAATGGAAC
spr0812_up1	30	69	ACAGGCTGTAATTTAGTCGGCAATGTGAAG
spr0812_up2	27	62	ATTAATAATATTTGCGCCAGCTTCATCC
<b>Bereich copY:</b>			
cop_up1	29	64	CTCTAATTCCCTTAAAGTGGGAACTAGAG
cop_up2	31	72	TTGACTGGACCAGAACCATGACCGAGTTGAG
copY_down1	26	69	GAGTTCCAGCGCAACCAAGGTATCC
copY_down2	29	66	CCTGCAACTAACATAATAGGCGTTGTTGC
copY_for	28	66	CCTAGATTGAGTCAGAGGGATCTAACAG
copY_fwd+ JanusLin	59	74	ACGTCCAAAAGCATAAGGAAAGGGGCCCAAGTAAGA TGTAATTGTATGTAAAGGAGACG
copY_rev	27	66	TCCCATGACTTCCACTCGAATCTCTTG
copY_rev + JanusLin	57	76	CGGATCCGATCCATTTCTCTGGAATAGGCCTGCCAT TCTGCATCTGAAATCTGCAT
Minigen copY for	51	70	ATGCAGATTTTCAGATGCAGAAATGGCAGGAAGTAAGAT GTAATTGTATGTAA
Minigen copY rev	51	70	TTACATACAATTACATCTTACTTCTGCCATTCTGCAT CTGAAATCTGCAT
<b>Fosmide M-C8 und S-E11 mit dexS:</b>			
dexS_up2	28	66	GTTGAGCCTTGATTTCTTCCCAGACAAC
dexS_up1	28	65	AGTCGCAGTGTTACAAGCAATGACAATC
dexS_down1	30	67	ACCTCAATACATGCTGCCATTTGCAGGAAC
dexS_down2	29	63	TTGTTCCAATGCTCTTGACTTTCTTCTTC
dexS_rev1_ JanusLinker	59	72	CGGATCCGATCCATTTCTCTGGAATAGGTATCAAAC ACTGGCTATTTATGTAAATTAA
dexS_fwd1_ JanusLinker	51	73	CGTCCAAAAGCATAAGGAAAGGGGCCCTACTTTTCTC TTATCAAGTGTCAT
Minigen_ dexSrev	54	66	ATGACACTTGATAAAGGAAAAGTATATCAAACACTGG CTATTTATGTAAATTAA
Minigen_ dexSfwd	54	66	TTAATTTACATAAATAGCCAGTGTTTGATATACTTTTC CTTTATCAAGTGTCAT
E7_fwd3	28	62	TAGGATTTTCATAATGTTGCCTTTCTCAC
E7_fwd4	31	62	TGTGACCAAAGAAGTAAGTATGGAATTTATC
E7_fwd5	29	65	GTCATGATGGAAGTTTACAACGTCATCTC

Bezeichnung	Länge [nt]	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz 5' → 3'
E7_fwd6	30	66	TGAAATAGCACAAATAGGGACGGAAGACTG
E7_rev2	27	63	CCTCATTAACAACCCAATCACCTAAAG
E7_rev3	32	63	TCCGTAACTCAGAATCGTATCAATATAAAGAC
E7_rev4	28	62	TGAAATTGGCTCATCTGCAATAACAAAG
E7_rev5	29	65	CTCATCCCTAAACCATAACCAACATAGTG
M-C8 1fwd	31	70	GGTATCTAAGCGGAGGCGGACTTGAATCAAC
M-C8 1rev	29	69	GCTGCCCTTGAGACCTTGTCCATTATTGC
M-C8 fwd3	28	62	GTATGAACCAAGTTCTCAAAGTCTTATC
M-C8 fwd5	30	66	TAACCGCGACAAACTTCTTACTTCCTTCAC
M-C8 fwd6	30	61	AATTACTAGACATTAAGACCCTAATATCC
M-C8 fwd8	30	69	ACACCCTTGTGCGGCCAGAAATTAACAACC
M-C8 rev3	31	70	CGGGAAGTAGCTCAGCTTGGTAGAGTACTTG
M-C8 rev4	32	68	ATGAATTCTCAGGCGGTCAACGTCAACGTATC
M-C8 rev5	29	69	CTGGCTGACTAGGAGGAAGGAAATGTCTG
M-C8 rev6	30	61	CTTTGTTAATCTCTTTGGTTTGAACTTTAC
M-C8 rev8	30	67	TCACTTCCTGCAACCATTTTCAGCCTATCTC
M-C8 rev9	30	70	CTACCAAGCATGCCATCGGCATTGTCTCTG
<b>Fosmid E/C2 mit <i>rpsI</i></b>			
#2hand1rev	28	65	GAATCAAAGCGGTAAATCCACGAGAAAC
#2hand2fwd	26	60	TTCTACGTTATTCAATAGCACTCTTC
#2hand2rev	25	58	TTCCACAGTTTCATGTAATTCATC
#2hand3rev	30	63	TTACGGTTACACCGATAATATTGGCAATAC
#2hand3fwd	30	63	TGTTCTATCTTTACAATGGCGATTTGAGTC
#2hand4fwd	29	63	TATTGGTGAATTGGCTTATATGGGATTTCG
E/C2_5rev	29	65	ACTAATTCCCTTGCCACCTTCTTGCCATCC
E/C2_7rev	30	61	CTATGGAATCTTGCATTATCCATAATATAG
E/C2_8fwd	28	68	AAACTAGCAGACCGCATGTGGGTATTGG
E/C2_8rev	30	69	CTGCAGAAAGACGTCCAAGTGGTACATCAG
E/C2_9fwd	30	70	CGATGGGAAGGAACCCCATCACCGTAAAC
E/C2_9rev	30	70	TTGTGCAGCATGAGTGTGCTCAGCTCCAAC
E/C2_10fwd	29	65	TGGATTGAAACAAATCTCTGCAGGTGAAC
E/C2_10rev	32	66	TTCAACTTTACGTGAGTCACGTGTAAGAAGTC

Angefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen:

<sup>1</sup>: *SphI*-Schnittstelle

<sup>2</sup>: *Bam*HI-Schnittstelle

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 D-Blutagar

Die Kultivierung von *S. pneumoniae* auf Festmedium wurde auf D-Blutagarplatten durchgeführt. Nach dem Autoklavieren wurde der D-Agar (Tab. 2. 9) auf 48 °C abgekühlt und mit 3 ml defibriniertem Schafsblut (Oxoid, Wesel) pro 100 ml D-Agar supplementiert. Bei Bedarf wurden Antibiotika zur Selektion (siehe 2.4) zugesetzt.

**Tab. 2. 9: Zusammensetzung des D-Blutagars**

Komponente	Menge
Glukose	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Hefeextrakt	1,25 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
autoklavieren, abkühlen auf 48 °C	
defibriniertes Schafsblut	3%

### 2.3.2 C-Medium (CpH8; nach Lacks und Hotchkiss, 1960)

In dieser Arbeit wurde das Wachstum von *S. pneumoniae* in dem semisynthetischen C-Medium durchgeführt, da *S. pneumoniae* recht komplexe Nährstoffanforderungen stellt. Die Komponenten des Mediums wurden einzeln hergestellt und vor Gebrauch zu C-Medium zusammenpipettiert (Tab. 2. 10).

**Tab. 2. 10: Zusammensetzung des C-Mediums**

Komponente	Menge [ml]
PreC	400
Supplement	13
Glutamin (1 mg/ml)	10
Pyruvat (2%)	5
Adams III	10
Phosphatpuffer, 1 M, pH8	15
Hefeextrakt (5%)	9

Tab. 2. 11: Einzelkomponenten

Komponente	Menge
<b>PreC</b>	
Natrium-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1l
pH mit NaOH auf 7,5 einstellen, autoklavieren	
<b>Supplement</b>	
3 in 1 Salts	60 ml
Glukose (20%)	120 ml
Saccharose (50%)	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
alle Komponenten einzeln autoklavieren und steril zusammenpipettieren	
<b>Adams III</b>	
Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	200 mg
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	1,6 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklem Gefäß lagern	
<b>Phosphatpuffer</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M	53 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M	947 ml
pH 8,0; Puffer autoklavieren	

Tab. 2. 12: Zusätze der Einzelkomponenten

Komponente	Menge
<b>3 in 1 Salts</b>	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 g
CaCl <sub>2</sub> , wasserfrei	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, 0,1 M	0,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1l
autoklavieren	
<b>Adams I</b>	
Biotin	0,15 mg
Nikotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl	175 mg
Ca-Pantothemat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklem Gefäß lagern	
<b>Adams II</b>	
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,2 g
HCl <sub>konz.</sub>	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklem Gefäß lagern	

### 2.3.3 LB-Medium

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium bzw. LB-Agar (Tab. 2. 13). Dazu wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (Endkonzentration) zugesetzt. Bei Bedarf wurden Antibiotika zur Selektion (siehe 2.4) zugesetzt.

Tab. 2. 13: Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Menge
Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
auf pH 7,9 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren	

## 2.4 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind in Tab. 2. 14 aufgeführt. Alle Antibiotika, außer Bacitracin, Tetracyclin und Vancoresmycin, wurden vor Verwendung frisch mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt. Die Stammlösungen für Bacitracin, Tetracyclin und Vancoresmycin wurden bei -20 °C gelagert.

Tab. 2. 14: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	nach Bedarf	100 µg/ml – 200 µg/ml ( <i>E. coli</i> )
Bacitracin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5 mg/ml	0,5 µg/ml - 6 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )
Chloramphenicol	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	nach Bedarf	12,5 µg/ml ( <i>E. coli</i> )
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	nach Bedarf	25 µg/ml ( <i>E. coli</i> ); 100-200 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )
Spectinomycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	nach Bedarf	80 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )
Streptomycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	nach Bedarf	200 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )
Tetracyclin	70% EtOH p. a.	3 mg/ml	3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )
Vancoresmycin	100% MeOH p. a.	0,5 mg/ml	0,3 µg/ml – 0,7 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Anzuchtbedingungen

#### *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* wurde in C-Medium aus Glycerinkulturen angeimpft und ohne Schütteln bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen in vorgewärmtem C-Medium entsprechend verdünnt und für weitere Experimente verwendet. In der Regel wurden die Kulturen am Vorabend angeimpft und in einem Eiswasserbad inkubiert bis eine gestellte Zeitschaltuhr die Inkubation bei 37 °C startete.

Zum Wachstum auf Festmedium wurden die Stämme mit einem abgeflamten Spatel aus einer Glycerindauerkultur auf D-Blutagar ausgestrichen oder 100 µl einer Flüssigkultur ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### *E. coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium aus Glycerinkulturen oder durch Abimpfen einer Kolonie mit einem Zahnstocher angeimpft und schüttelnd bei 37 °C im Brutraum inkubiert. Das Wachstum auf Festmedium erfolgte auf LB-Agar bei 37 °C, wobei die Zellen mit einem abgeflamten Spatel aus einer Glycerindauerkultur ausgestrichen wurden oder 100 µl einer Flüssigkultur ausplattiert wurde.

### 2.5.2 Stammkonservierung

Zur dauerhaften Stammkonservierung wurden Glycerindauerkulturen angelegt. Dazu wurden 200 µl Glycerin in einem Cryoröhrchen vorgelegt und mit 1,2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur versetzt. Durch Vortexen wurde die Probe gut gemischt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

### 2.5.3 Wachstumsmessungen

Das Wachstum von *E. coli* wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) in einem Photometer (Ultraspec III UV/Visible Spectrophotometer, Uppsala, Schweden) verfolgt.

Das Wachstum von *S. pneumoniae* wurde aufgrund der teilweise ausgeprägten Kettenbildung nicht durch Messung der OD verfolgt, sondern durch Messung der Lichtstreuung der Zellen mit einem Nephelometer (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems, London, England). Nach halblogarithmischer Darstellung der Messwerte erfolgte die Bestimmung der Wachstumsrate (=μ) bzw. Generationszeit (=g) aus dem linearen Bereich der Wachstumskurve (exponentieller Wachstumsbereich) nach der Formel:

$$\mu [\text{min}^{-1}] = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

(μ = Wachstumsrate, N<sub>1</sub> = Nephelowert zum Zeitpunkt t<sub>1</sub>, N<sub>0</sub> = Nephelowert zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>, (t<sub>1</sub>-t<sub>0</sub>) = Zeitdifferenz)

Die Berechnung der Generationszeit g ergibt sich aus der Formel:

$$g [\text{min}] = \frac{\ln 2}{\mu}$$

(g = Generationszeit, μ = Wachstumsrate)

### 2.5.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt die Antibiotikakonzentration an, bei der gerade kein Bakterienwachstum mehr zu beobachten ist. Die Bestimmung erfolgte auf D-Blutagarplatten mit steigenden Konzentrationen eines Antibiotikums. Von dem zu testenden *S. pneumoniae*-Stamm wurde eine exponentiell wachsende Vorkultur 1:20 in 8 ml vorgewärmten C-Medium verdünnt und bis zu einem Nephelowert von N = 30 wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurden 5 µl entnommen und in 995 µl C-Medium gut gemischt. Davon wurden 25 µl auf D-Blutagarplatten aufgetropft. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 24 h ausgewertet.



### 2.5.5 Zellplattierungseffizienz (efficiency of plating, EOP)

In einigen Experimenten wurde neben bzw. statt einer MHK-Bestimmung eine Zellplattierungseffizienz (efficiency of plating, EOP) aufgrund der höheren Genauigkeit ermittelt. Dazu wurde eine exponentiell wachsende Vorkultur 1:20 in 8 ml vorgewärmten C-Medium verdünnt und bis zu einem Nephelwert von  $N = 50$  inkubiert. Der zu testende Stamm wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Blutagarplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Antibiotikum bzw. ohne Antibiotikum ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde der Zelltiter sowohl mit als auch ohne Antibiotikum berechnet. Der berechnete Zelltiter auf den Platten einer bestimmten Antibiotikakonzentration wurde im Verhältnis zum Zelltiter ohne Antibiotikum in % Wachstum angegeben.

$$\text{EOP [\%]} = \frac{N_{\text{AB}}}{N_{\text{L}}} \times 100$$

(EOP = Zellplattierungseffizienz (efficiency of plating);  $N_{\text{AB}}$  = Zelltiter pro ml auf einer bestimmten Antibiotikumkonzentration,  $N_{\text{L}}$  = Lebendkeimzahl pro ml)

### 2.5.6 Phasenkontrastmikroskopie

Präparate für die mikroskopische Analyse wurden aus wachsenden Flüssigkulturen angefertigt. Dabei wurden 5 µl einer Kultur auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt, das vorsichtig festgedrückt wurde. Die mikroskopische Analyse wurde am Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600 (Nikon, Düsseldorf) durchgeführt. Zur Einstellung der Fokussierungsebene wurde die 40fache Vergrößerung gewählt. Anschließend wurde das Immersionsöl-100fach-Objektiv benutzt, um die Zellen zu analysieren. Die Photographien wurden mit der Kameraeinrichtung CDD-1300B durchgeführt und auf dem Bildverarbeitungsprogramm LUCIA Image Version 4.81 (Laboratory Imaging Lts. 2003, Hostivar) visualisiert.

### 2.5.7 Makroskopische Analyse

Die Morphologie von Einzelkolonien auf D-Blutagarplatten wurde an einem Makrostand mit integrierter Beleuchtung analysiert (Macrostand M-CXL-48-50, Synoptics Ltd., Syncroscopy, Cambridge, England). Über das Objektiv AF NIKKOR (Nikon GmbH, Düsseldorf) und das digitale Interface DFW-X700 (Sony Corporation, Tokyo) wurde die Bilder zur Dokumentation an das Bildverarbeitungsprogramm LUCIA Image Version 4.81 (Laboratory Imaging Lts. 2003, Hostivar) gesendet.

### 2.5.8 Herstellung und Transformation natürlich kompetenter Zellen von *S. pneumoniae*

Zur Herstellung natürlich kompetenter Zellen von *S. pneumoniae* wurde eine logarithmisch wachsende Vorkultur 1:40 in vorgewärmten C-Medium mit BSA-Zusatz (0,072% Endkonzentration) verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Bei einer Zelldichte von  $N = 30$  wurden 5 ml Kultur mit 1 ml Glycerin gründlich gevortext und in Eppendorfreagenzgefäße (ERG) portioniert. Die Zellen wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. In der midexponentiellen Phase bei  $N = 30$  zeigt eine Kultur von *S. pneumoniae* R6 gewöhnlich die größte Kompetenz.

Zur Transformation wurden die weggefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1:10 in frischem C-Medium mit 0,072% BSA verdünnt. 200 µl Zellen wurden mit 50 - 500 ng DNA gemischt und 30 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert (zur DNA-Aufnahme und Rekombination). Anschließend wurden die Zellen zur phänotypischen Expression des jeweiligen Selektionsmarker 120 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Bei Standardtransformationen wurden 100 µl unverdünnt und in Verdünnungen auf Blutagarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Wenn auf das Antibiotikum Vancoresmycin selektioniert wurde, so wurde aufgrund der limitierten Menge an Vancoresmycin in kleine Petrischalen (Ø 5 cm) 30 µl Zellen ausplattiert. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte durch Bestimmung des Transformantentiters auf Platten mit Antibiotikum und des Zelltiters auf Platten ohne Antibiotikum nach folgender Formel:

$$TE [\%] = \frac{N_T}{N_L} \times 100$$

(TE = Transformationseffizienz,  $N_T$  = Transformantentiter pro ml,  $N_L$  = Lebendkeimzahl pro ml)

Um die Kompetenz präparierter Zellen in *S. pneumoniae* zu überprüfen, wurden in der Regel 100 ng chromosomale DNA aus dem *S. pneumoniae* Stamm amiA9 (Str<sup>R</sup>, Salles *et al.* 1992), wie oben beschrieben, transformiert und in verschiedenen Verdünnungen auf Blutagarplatten mit 200 µg/ml Streptomycin und ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Berechnung der Transformationseffizienz erfolgte wie oben angegeben.

### 2.5.9 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* (modifiziert nach Dower *et al.*, 1988)

Bei Verwendung von elektrokompenten Bakterienzellen wird die Zellmembran durch einen kurzzeitigen elektrischen Impuls permeabilisiert, wodurch das Eindringen von Plasmid-DNA ermöglicht wird.

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,7

inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden in sterile Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 200 ml eiskalten sterilen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und die Zellen zentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 100 ml eiskalten sterilen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und zentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde anschließend in 30 ml eiskalter steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und zentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 °C). Im letzten Schritt wurde das Pellet in 500 µl eiskalter steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in 40 µl aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) auf Eis vorgekühlt. Die Zellen wurden anschließend in die Küvette transferiert, durch Auf- und Abpipettieren mit der vorgelegten DNA gemischt und für kurze Zeit (1-2 min) auf Eis inkubiert. Die DNA sollte möglichst ionenfrei sein, weshalb vor Transformationen Ligationsansätze gefällt (siehe 2.6.4) und in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen wurden.

Die Elektroporation wurde mit Hilfe des GenePulser™ (Bio-Rad Laboratories, München) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Spannung:  $U = 2,1 \text{ kV}$

Kapazität:  $C = 25 \text{ } \mu\text{F}$

Widerstand:  $R = 200 \text{ } \Omega$

Die Pulsdauer betrug zwischen 4,2 und 4,8 msec, abhängig von der Ionenkonzentration. Nach dem Elektropuls wurden sofort 200 µl LB-Medium in die Küvette gegeben und gemischt. Die Suspension wurde in ein Glasröhrchen mit vorgelegten 800 µl LB-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 µl unverdünnter bzw. verdünnter Transformationsansatz auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.5.10 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (modifiziert nach Hanahan, 1983)**

Um chemisch kompetente *E. coli* Zellen zu präparieren, wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C schüttelnd inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geerntet. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, in Zentrifugenröhrchen aufgeteilt (je 50 ml) und zentrifugiert (8000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 16 ml kaltem TFB1-Puffer (Tab. 2. 15) resuspendiert, und die Zellen 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (8000 rpm, 10 min, 4 °C), und das Pellet in 1,6

ml eiskaltem TFB2-Puffer (Tab. 2. 15) resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80$  °C gelagert.

Zur Transformation wurden 100  $\mu$ l Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden danach 2 min auf Eis inkubiert, bevor 1 ml LB-Medium zugegeben wurde. Der Ansatz wurde in ein Glasröhrchen transferiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unverdünnt bzw. verdünnt auf Selektivmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

**Tab. 2. 15: Zusammensetzung des TFB1-Puffers und TFB2-Puffers**

Puffer	Komponente	Konzentration
TFB1-Puffer	MnCl <sub>2</sub>	100 mM
	Kaliumacetat	50 mM
	CaCl <sub>2</sub>	30 mM
	Glycerin	15%
	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern	
TFB2-Puffer	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15%
	pH 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern	

### 2.5.11 Blau-Weiß-Screening

Rekombinante *E. coli* Klone wurden mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings identifiziert. Vektoren, wie beispielsweise pWSK129 und pUC19, codieren für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*). Dieses Fragment ist inaktiv, solange es nicht durch das C-terminale  $\omega$ -Fragment, das von bestimmten Wirtsstämmen (*lacZ* $\Delta$ M15) codiert wird, komplementiert wird. Die aktive  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG, wobei der Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-indigo freigesetzt wird, der die Kolonien blau färbt. Im *lacZ*-Gen des Vektors befindet sich die multiple Klonierungsstelle. Wird ein Insert kloniert, so wird das N-terminale  $\alpha$ -Fragment nicht exprimiert, die aktive  $\beta$ -Galaktosidase wird nicht gebildet und die Kolonien bleiben weiß (Ullmann & Perrin, 1970).

Für das Screening wurde nach Autoklavieren des Agars und Abkühlen auf ca. 48 °C X-Gal in einer Endkonzentration von 80  $\mu$ g/ml (in Dimethylformamid gelöst), und IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM (in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst) zugesetzt.

## **2.6 Isolation, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren**

### **2.6.1 Isolation chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* (modifiziert nach Marmur, 1961)**

Zur Isolation genomischer DNA aus *S. pneumoniae* wurde eine 10 ml-Kultur bei einem Nephelowert zwischen 60 und 70 geerntet. Die Kultur wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) transferiert und zentrifugiert (8000 rpm, 5 min, RT). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei ERG zu je 1 ml verteilt und zentrifugiert (14.000 rpm, 1 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren bzw. direkt in die nachfolgende Isolation eingesetzt.

Die Zellen wurden etwa 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 180 µl TE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl RNase (10 mg/ml) wurden die Zellen 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zelllyse erfolgte durch die Zugabe von 200 µl 2% SDS und Inkubation bei 37 °C. Nach Aufklaren der Suspension (etwa 5 min) wurden 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; äquilibriert mit TE-Puffer) versetzt und 30 min auf einem Schüttler gerüttelt. Nach einer Zentrifugation (14.000 rpm, 3 min, RT) wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues ERG überführt. Die eben beschriebene Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde ein weiteres Mal durchgeführt, wobei die Proben 20 min auf dem Schüttler gerüttelt wurden. Die in der Oberphase enthaltene DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol (100% p. a.), Mischen und 10-minütiger Inkubation bei RT gefällt. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit je 200 µl Ethanol (70%) gewaschen und 5 - 10 min bei 50 °C getrocknet. Das Lösen des DNA-Pellets erfolgte in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C. Genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert. Aus 10 ml Zellvolumen konnten 5-10 µg genomische DNA erhalten werden.

### **2.6.2 Plasmidpräparation aus *E. coli***

Die Isolierung von Plasmiden basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim & Doly (1979).

Eine 1,5ml-Übernachtskultur wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 30 sec, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer (Tab. 2. 16) vollständig resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl NaOH/Triton (Tab. 2. 16), 4 - 6maliges Invertieren und Inkubation für 2-5 min bei RT wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 150 µl eiskaltes 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zugegeben und 15 bis 20 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (14.000 rpm, 20 min, RT) wurde der Überstand mit

450 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, RT). Das Pellet wurde mit 250 µl Isopropanol gewaschen und anschließend bei 50 °C ca. 10 min getrocknet. Die DNA wurde in 30 - 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute betrug zwischen 2 und 5 µg Plasmid-DNA.

Wenn mehr Ausgangszellmaterial verwendet wurde, wurden die Volumina der zugegebenen Puffer erhöht. In Tab. 2. 16 sind die zur Plasmidisolierung verwendeten Lösungen aufgeführt.

**Tab. 2. 16: Lösungen zur Plasmidpräparation aus *E. coli***

Komponente	Bestandteile, Menge/Konzentration
GTE-Puffer	Glucose (50 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), EDTA (50 mM, pH8,0)
NaOH/Triton	NaOH (0,2 N), Triton X100 (1%)
Natriumacetat	Natriumacetat (3 M, pH 4,8)
TE-Puffer	Tris-HCl (10 mM, pH 8,0), EDTA (1 mM, pH 8,0)
Isopropanol	100% p. a.

Für einige Anwendungen, wie z. B. Sequenzierungen, wurde sehr reine Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert. Auch Fosmide wurden mit diesem Kit isoliert, da die Ausbeute wesentlich höher war als nach Durchführung der oben beschriebenen Methode. Allerdings wurde hierbei das Volumen der Puffer P1, P2 und N3 verdoppelt, da das Zellvolumen in der Regel aufgestockt war.

Zur Präparation einer größeren Plasmidmenge wurde das Kit NucleoBond PC100 (Macherey & Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben verwendet.

### 2.6.3 Phenolextraktion

Durch eine Phenolextraktion wurden Proteine aus einer DNA-Lösung entfernt. Bei geringen Volumina wurde die DNA-Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Als Karrier wurde 1 µl Glycogen (10mg/ml) zugegeben. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol (äquilibriert mit TE-Puffer) versetzt, 5 min auf einem Schüttler gerüttelt und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Falls die Interphase nicht klar war, wurde die Oberphase erneut mit 1 Vol. Phenol (äquilibriert mit TE-Puffer) versetzt, 5 min geschüttelt und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde die wässrige Oberphase vorsichtig abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt. Der Ansatz wurde 5 min auf einem Schüttler gerüttelt und dann zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Oberphase, die die gereinigte DNA enthielt, wurde nun präzipitiert (siehe 2.6.4).

### 2.6.4 DNA-Präzipitation

Zur DNA-Präzipitation wurden wässrige DNA-Lösungen mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2, gut gemischt. Als Fällungshilfe wurde 1 µl Glycogen (10 mg/ml) zugesetzt. Die Lösung

wurde mit 2,3 Vol. -20°C kaltem Ethanol (100% p. a.) versetzt und mindestens 1 h bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig mit Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde durch Abpipettieren vollständig entfernt. Die DNA wurde ca. 10 min bei 55 °C getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen.

Statt einer Fällung mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und 2,3 Vol. eiskaltem Ethanol (100% p. a.) kann DNA auch mit 1 Vol. Isopropanol gefällt werden (siehe 2.6.1 und 2.6.2). Dabei wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, RT).

### 2.6.5 DNA-Elution aus Agarosegelen

Um DNA aus Agarosegelen zu eluieren, wurde auf zwei verschiedene Kits zurückgegriffen. Beide Kits enthielten eine Lösung, in der chaotrope Salze (z. B. Natriumiodid, Guanidinisothiocyanat, Natriumperchlorat) gelöst waren, wodurch die DNA aus der Agarose herausgelöst wurde. Das Kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Düren) wurde nach Herstellerangaben zur Elution kleinerer DNA-Mengen verwendet.

Größere DNA-Mengen, die während der Größenfragmentierung von restringierter genomischer DNA angefallen waren, wurden mit Hilfe des Kits GeneClean<sup>®</sup> (Qbiogene, Heidelberg) aus dem Agarosegel eluiert. Die Herstellerangaben wurden folgendermaßen modifiziert: pro Gramm Agarose wurden 30 µl Glasmilch zugegeben und mind. 1 h auf einem 3D-Wipptisch rotiert. Die Lösung wurde dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte zweimal mit je 100 µl TE-Puffer. Die Probe wurde anschließend phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.6.3 und 2.6.4).

Während der Erstellung einer Fosmidgenbank wurde DNA aus einem Low-Melting-Agarosegel isoliert (siehe 2.8).

### 2.6.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem Jet Quick PCR Purification Spin Kit (Genomed, Löhne) und mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Reinigungsschritt diente zur Entfernung der Polymerase sowie überschüssiger Oligonukleotide aus dem Reaktionsansatz.

### 2.6.7 Präparation von Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae*

Um Kontaminationen durch RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte, bei denen RNA beteiligt war, mit Handschuhen durchgeführt. Pipetten wurden bei 200 °C hitzesterilisiert und angesetzte Puffer wurden zweimal autoklaviert. Außerdem wurden

Filterspitzen verwendet. DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat), das zum Lösen der RNA und zum Ansetzen der 70%igen Ethanollösung verwendet wurde, wurde kommerziell erworben (Ambion, Woodward Austin, USA). Wasser, das mit DEPC behandelt worden ist, sollte nicht mit RNasen kontaminiert sein, da DEPC kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet, wie z.B. an die für die katalytische Funktion wichtigen Histidinseitenketten in den aktiven Zentren vieler RNasen. Dadurch werden die RNasen irreversibel inhibiert.

### Isolation von Gesamt-RNA

Die im Folgenden beschriebene Methode zur RNA-Isolation basiert auf der 'Hot-Phenol'-Methode nach Maes & Messens (1992).

Eine Übernachtskultur wurde 1:40 in 100 ml vorgewärmten C-Medium verdünnt und bei 37 °C im Wasserbad bis zu einer Zelldichte von  $N = 80$  inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, RT) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Zellen wurden in 4 ml auf 60 °C vorgewärmte NAE-gesättigte Phenol-Chloroform-Lösung (6:1) resuspendiert und 5 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurden 4 ml auf 60 °C vorgewärmter NAES-Puffer zugegeben, durch Invertieren gründlich gemischt und 5 min bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wurde dann 5 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (8000 rpm, 8 min, 4 °C). Die wässrige Oberphase wurde in ein 'heavy' 'Phase-Lock-Gel'<sup>TM</sup>-Röhrchen transferiert (Murphy und Hellwig, 1996), in dem bereits 4 ml Phenol/Chloroform (6:1; RT) vorgelegt waren. Das Röhrchen wurde 2 min manuell invertiert und anschließend zentrifugiert (8000 rpm, 8 min, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein weiteres 'Phase-Lock-Gel'<sup>TM</sup>-Röhrchen transferiert und die Phenolextraktion wiederholt. Die in der wässrigen Oberphase enthaltenen Nukleinsäuren wurden mit 400 µl 3 M Natriumacetat (pH 5) und 4 ml Isopropanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (8000 rpm, 40 min, 4 °C) wurde das Pellet mit 3 ml Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde im Exsikkator getrocknet und in 300 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. In Tab. 2. 17 sind die zur RNA-Isolation verwendeten Lösungen aufgeführt.

**Tab. 2. 17: Reagenzien zur RNA-Isolation nach der 'Hot-Phenol'-Methode**

Komponente	Bestandteile, Menge/Konzentration
Phenol/Chloroform (6:1)	50 ml Phenol (äquilibriert mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ) + 10 ml Chloroform
NAE-Puffer	Natriumacetat (50 mM, pH 5,1), EDTA (10 mM)
NAES-Puffer	Natriumacetat (50 mM, pH 5,1), EDTA (10 mM), SDS (1%)
Isopropanol	100% p. a.
Ethanol	70%; angesetzt mit DEPC-H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	Ambion, Woodward Austin, USA



## DNase-Behandlung

Die in der RNA-Lösung vorhandene DNA wurde mit Hilfe des Enzyms DNaseI (RNase-frei; New England Biolabs, Ipswich, USA) degradiert. Ein Ansatz zur DNase-Behandlung setzte sich wie folgt zusammen (Tab. 2. 18).

**Tab. 2. 18: Zusammensetzung des DNaseI-Verdau**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
RNA-Lösung	300
DNaseI Puffer (10fach)	34,7
RNase freie DNaseI (2 U/ $\mu$ l)	12

Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37 °C. Anschließend wurde die RNA-Lösung mit dem RNeasy Midiprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA-Elution wurde zweimal mit je 150  $\mu$ l DEPC- H<sub>2</sub>O durchgeführt.

Die Qualität der präparierten RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.6.9). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Nano Drop ND-1000 (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen) (siehe 2.6.8). Aus 100 ml Zellvolumen konnten zwischen 120 und 270  $\mu$ g Gesamt-RNA isoliert werden.

### 2.6.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

#### Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA kann durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml bzw. einer ssRNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ml.

Bei einer Wellenlänge von 280 nm haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. Durch den Koeffizienten  $A_{260}/A_{280}$  werden daher eventuelle Proteinkontaminationen erkannt. Ein Koeffizient zwischen 1,8 und 2,0 deutet auf einen hohen Reinheitsgrad hin.

Die Konzentration von DNA und RNA sowie der Koeffizient  $A_{260}/A_{280}$  wurden automatisch mit Hilfe des Nano Drops ND-1000 (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Als Referenz diente das entsprechende Lösungsmittel der Probe.

#### DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Konzentrationen wurden auch mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.6.9) bestimmt. Dazu wurde die Probe in Verdünnungen mit einer Verdünnungsreihe an bekannter DNA (pBR322: 25 ng, 50 ng, 100 ng) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben mit

Ethidiumbromid konnte durch Vergleich der Bandenintensitäten die Konzentration abgeschätzt werden.

### 2.6.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Fragmente wurden ihrer Größe nach mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen, wodurch das Molekül während der Elektrophorese zur Anode wandert. Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarose wurde in TEE-Puffer in der Mikrowelle vollständig geschmolzen und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Die Probenaschen wurden mit Hilfe eines Kammes hergestellt. Das gelierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und etwa einen halben Zentimeter mit TEE-Puffer überschichtet. Nach Zugabe eines Probenpuffers (Loading Dye) wurde die Probe in die Taschen pipettiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene Glycerin wird die Dichte der DNA- bzw. RNA-Lösung erhöht, und die Probe sinkt in die Geltasche. Zudem diente der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau als Indikator für die zurückgelegte Laufstrecke. Es wurde eine Spannung von 80 – 130 V für 45 min bis 120 min angelegt. Zur Vorbereitung eines präparativen Gels wurden fünf bis sechs Zinken eines Kammes abgeklebt, so dass eine große Tasche mit ca. 100 µl Probe befüllt werden konnte.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Nukleinsäuren durch Gelfärbung mit dem interkalierenden, fluoreszierenden Ethidiumbromid (5 µg/ml) und anschließender Visualisierung auf einem UV-Transilluminator (Appligene Oncor M-20, Heidelberg) detektiert. Für analytische Zwecke wurde eine Wellenlänge von 254 nm verwendet, für präparative Zwecke 365 nm. Nachdem die Gele mit einer Geldokumentationsanlage („digit-Store duo“, Fa. INTAS, Göttingen) fotografiert worden waren, wurden die Photos mit dem Videoprinter (Mitsubishi Video Copy Prozessor P61E, Japan) ausgedruckt.

Der TEE-Puffer in der Elektrophoresekammer sowie das Ethidiumbromidbad wurden immer durch frische Lösungen ersetzt. Für RNA-Proben wurde ein gesonderter Probenpuffer verwendet. In Tab. 2. 19 sind die für die Gelelektrophorese benötigten Reagenzien aufgeführt.

**Tab. 2. 19: Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Komponente	Bestandteile, Menge/Konzentration, Hersteller
50fach TEE-Puffer	Tris (242 g), Eisessig (57,1 ml), EDTA (100 ml, 0,5 M pH 8,0), H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1 l
Agarose	SeaKem LE-Agarose (FMC Biozym, Rockland ME, USA)
DNA-Probenpuffer	Gel Loading Dye, Blue, 6x (New England Biolabs, Ipswich, USA) 6X Loading Dye Solution (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
Ethidiumbromid	Stocklösung (10 mg/ml), Endkonzentration ca. 5 µg/ml (Applichem GmbH, Darmstadt)
Größenmarker	Ready load 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) GeneRuler™ 1 kb Ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) GeneRuler™ 100 bp Ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
RNA-Probenpuffer	2X RNA Loading Dye (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)

## 2.7 Klonierungstechniken und DNA-Modifikation

### 2.7.1 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die spezifische, meist palindromische kurze Sequenzen in einem DNA-Molekül erkennen und in definierter Weise hydrolysieren, so dass entweder kohäsive oder glatte Enden entstehen. Die Menge an eingesetztem Restriktionsenzym wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{U}{\mu\text{g DNA (a)}} = \frac{MW(\lambda) \times N(a)}{MW(a) \times N(\lambda)}$$

(U = Enzymunits, MW (λ) = Molekulargewicht der λ-Phagen DNA, N (a) = Zahl der Schnittstellen in der zu schneidenden DNA, MW (a) = Molekulargewicht der zu schneidenden DNA, n (λ) = Zahl der Schnittstellen des Enzyms in der λ-Phagen-DNA, a = eingesetzte DNA in µg)

Die berechnete Menge Enzym wurde im mehrfachen Überschuss eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass das zugegebene Enzymvolumen maximal 10% des Reaktionsansatzes betrug, um unspezifische Enzymaktivitäten zu vermeiden. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Die Inkubationszeit betrug zwischen 1 h und 2,5 h. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden gemäß der Herstellerangaben bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Überprüfung einer erfolgreichen Restriktionshydrolyse erfolgte gelelektrophoretisch (siehe 2.6.9).

### 2.7.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase

Um eine Religation des restringierten Vektors bei nachfolgenden Ligationsreaktionen zu vermeiden, wurden die Phosphatgruppen an den 5'-Enden durch alkalische Shrimp Phosphatase (SAP; Roche, Mannheim) abgespalten. Die Reaktion wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Die Vektoren pCC1FOS<sup>TM</sup> und pUC19 wurden, restringiert und dephosphoryliert, kommerziell erworben.

### 2.7.3 Auffüllreaktion von kohäsiven Enden mit T4 DNA Polymerase

PCR-Produkte, die mit der *Taq* DNA Polymerase Red Goldstar<sup>TM</sup> (Eurogentec, Seraing, Belgien) amplifiziert werden, haben einzelsträngige TA-Überhänge an ihren 5'-Enden, wodurch diese nicht direkt in 'blunt-end'-Ligationen eingesetzt werden können. Durch das Enzym T4 DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) wurden die kohäsiven Enden zu glatten Enden aufgefüllt. Der Reaktionsansatz setzte sich gemäß Herstellerangaben zusammen. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37 °C. Das Enzym wurde durch 10minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz aufgereinigt (siehe 2.6.6), in 33 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert und in die folgende Reaktion eingesetzt (siehe 2.7.4).

### 2.7.4 Phosphorylierung von 5'-Enden mit T4 Polynukleotidkinase

PCR-Produkte können aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe am 5'-Ende nicht direkt in eine Ligation eingesetzt werden. Das Enzym T4 Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim) phosphoryliert die 5'-Hydroxylenden. Eine 0,1 M ATP-Lösung wurde in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt, sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Reaktionsansatz setzte sich gemäß Herstellerangaben (Tab. 2. 20) zusammen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Der Ansatz wurde aufgereinigt (siehe 2.6.6) und in die Ligationsreaktion (siehe 2.7.5) eingesetzt.

**Tab. 2. 20: Zusammensetzung der Phosphorylierungsreaktion von 5'-Enden**

Reagenz	Menge [µl]
PCR-Produkt (0,5 µg – 1,5 µg)	x <sup>1</sup>
0,1 M ATP	1
T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl)	2
10fach Puffer	4
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 40

<sup>1</sup>: x = entsprechendes Volumen für 0,5 µg – 1,5 µg PCR-Produkt

### 2.7.5 Ligation von DNA- und RNA-Molekülen

Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen, so dass zwei DNA- bzw. RNA-Fragmente miteinander verbunden werden. In einer 16stündigen Inkubation bei 16 °C wurden DNA-Ligationen mit T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA; New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt. Das zu klonierende Fragment wurde im dreifach (kohäsive Enden) bzw. im fünffach (glatte Enden)

molaren Überschuss im Vergleich zum Vektor (ca. 0,15 - 0,3 pmol) zugegeben. Der Ligationsansatz wurde nach den entsprechenden Herstellerangaben zusammenpipettiert.

Sollte der Ligationsansatz in einer Elektrotransformation (siehe 2.5.9) eingesetzt werden, wurde der Ansatz zuvor mit Phenol extrahiert (siehe 2.6.3), mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.6.4) und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde eine RNA-Ligation durchgeführt (siehe 2.10). Dabei wurde die T4 RNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) benutzt und 16 h bei 18 °C inkubiert.

Zur Erstellung von Fosmidgenbanken wurde die Fast-Link™ DNA Ligase (EPICENTRE, Madison, USA) unter veränderten Bedingungen verwendet (siehe 2.8).

### 2.7.6 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

In Polymerase-Kettenreaktionen wird DNA in vitro durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt. Prinzipiell basiert eine PCR auf eine bestimmte Temperaturabfolge, die sich 20-40 Mal wiederholt: Im Denaturierungsschritt, der bei einer Temperatur von 96 °C – 98 °C abläuft, wird die doppelsträngige Template-DNA in ihre beiden Einzelstränge getrennt. In der anschließenden Annealingphase, die bei ca. 50-60 °C erfolgt, hybridisieren zwei spezifische Oligonukleotide am 5'- und am 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs an die ihnen komplementäre einzelsträngige DNA. In der Elongationsphase verlängert die DNA-Polymerase ausgehend von den Oligonukleotiden die DNA in 5' → 3'-Richtung mit frei vorliegenden dNTPs. Die Elongation, die in der Regel bei 72 °C ausgeführt wird, wird so lange fortgesetzt bis die DNA-Polymerase von der DNA dissoziiert oder die Reaktion durch Temperaturerhöhung eines anschließenden Denaturierungsschrittes unterbrochen wird.

In dieser Arbeit wurde je nach Anwendung auf verschiedene Polymerasen zurückgegriffen, die in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden. Im Anschluss daran werden einige spezielle PCR-Techniken beschrieben, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die PCRs wurden in Thermocyclern (T1 Thermocycler, T-Gradientcycler, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

#### **Taq DNA Polymerase**

Zur standardmäßigen Amplifizierung von DNA-Fragmenten und zur Kontrolle von Genomintegrationen wurde die Taq DNA Polymerase Red Goldstar™ (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Dieses Enzym, das aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* stammt, besitzt eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität, jedoch keine 3' → 5' 'proofreading' Exonukleaseaktivität. In den folgenden Tabellen werden die

Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase (Tab. 2. 21) und das dazu verwendete Programm (Tab. 2. 22) angegeben.

**Tab. 2. 21: Zusammensetzung eines 100 µl PCR-Reaktionsansatzes mit *Taq* DNA Polymerase**

Komponente	Menge [µl]	Endkonzentration
10fach Puffer	10	1x
dNTPs (10mM)	4	0,4 mM
sense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,1 pmol/µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,1 pmol/µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	16	4 mM
Template-DNA	1-5 <sup>1</sup>	
<i>Taq</i> DNA Polymerase Red Goldstar™ (5 U/µl)	0,5	0,025 U/µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100	

<sup>1</sup>: abhängig von Konzentration und Template-DNA

**Tab. 2. 22: PCR-Programm bei Verwendung der *Taq* DNA Polymerase**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1) Denaturierung	96	60
2) Denaturierung	96	30
3) Annealing	52-60 <sup>1</sup>	30
4) Elongation	72	60/1 kb Produkt <sup>2</sup>
5) Terminale Elongation	72	300
6) Pause	10	∞

Die Schritte 2) bis 4) wurden 29 Mal wiederholt.

<sup>1</sup>: Annealingtemperatur = Primerschmelztemperatur – 3 °C

<sup>2</sup>: Die Elongationszeit betrug pro 1 kb 60 sec.

### iProof DNA Polymerase

PCR-Produkte, die zur Klonierung eingesetzt wurden oder eine Länge von mehr als 4 kb besaßen ('Long-Range'-PCR), wurden mit Hilfe der iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories, München) amplifiziert. Diese Polymerase besitzt zum einen eine 3' → 5' 'proofreading' Exonukleaseaktivität, die eine im Vergleich zur *Taq* DNA Polymerase verminderte Fehlerrate gewährleistet, und zum anderen ist sie in der Lage wesentlich längere DNA-Moleküle in kürzerer Zeit zu synthetisieren. Ein PCR-Reaktionsansatz unter Verwendung der iProof DNA Polymerase setzte sich zusammen wie in Tab. 2. 23 angegeben. Die Durchführung erfolgte wie in Tab. 2. 24 aufgeführt.

**Tab. 2. 23: Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Reaktionsansatzes mit iProof DNA Polymerase**

Komponente	Menge [µl]	Endkonzentration
5fach iProof HF Puffer	10	1x
dNTPs (10mM)	2	0,4 mM
sense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,2 pmol/µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,2 pmol/µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1 <sup>1</sup>	1 mM
Template-DNA	1-5 <sup>2</sup>	
iProof DNA Polymerase (2 U/µl)	1	0,04 U/ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50	

<sup>1</sup>: Zusatz bei Amplifizierung längerer PCR-Produkte (> 7 kb)

<sup>2</sup>: abhängig von Konzentration und Templatekonzentration

**Tab. 2. 24: PCR-Programm bei Verwendung der iProof DNA Polymerase**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
1) Denaturierung	98	60
2) Denaturierung	98	15
3) Annealing	60-66 <sup>1</sup>	20
4) Elongation	72	25/1 kb Produkt <sup>2</sup>
5) Terminale Elongation	72	300
6) Pause	10	∞

Die Schritte 2) bis 4) wurden 29 Mal wiederholt.

<sup>1</sup>: Annealingtemperatur = Primerschmelztemperatur

<sup>2</sup>: Die Elongationszeit betrug pro 1 kb 25 sec.

### Herculase DNA Polymerase

Zur Amplifizierung längerer PCR-Produkte wurde neben der iProof DNA Polymerase auch die Herculase<sup>®</sup> Enhanced DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Bei dieser Polymerase handelt es sich um ein Gemisch aus überwiegend *Pfu* DNA Polymerase, kombiniert mit einem thermostabilen „ArchaeMaxx<sup>™</sup> polymerase-enhancing factor“ und einem kleinen Anteil an *Taq2000<sup>™</sup>* DNA Polymerase. Diese Polymerase verfügt über eine 3' → 5' 'proofreading' Exonukleaseaktivität. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tab. 2. 25 wieder gegeben, der Ablauf des verwendeten PCR-Programms ist in Tab. 2. 26 aufgeführt.

**Tab. 2. 25: Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Reaktionsansatzes mit Herculase DNA Polymerase**

Komponente	Menge [µl]	Endkonzentration
10fach Puffer	5	1x
dNTPs (10mM)	2	0,4 mM
sense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,2 pmol/µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1	0,2 pmol/µl
Template-DNA	1-5 <sup>1</sup>	
Herculase DNA Polymerase (5 U/µl)	1	0,1 U/µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50	

<sup>1</sup>: abhängig von Konzentration und Template-DNA

**Tab. 2. 26: PCR-Programm bei Verwendung der Herculase DNA Polymerase**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1) Denaturierung	96	300
2) Denaturierung	96	30
3) Annealing	52-60 <sup>1</sup>	30
4) Elongation	72	60/1 kb Produkt <sup>2</sup>
5) Terminale Elongation	72	600
6) Pause	10	∞

Die Schritte 2) bis 4) wurden 29 Mal wiederholt.

<sup>1</sup>: Annealingtemperatur = Primerschmelztemperatur – 3 °C

<sup>2</sup>: Die Elongationszeit betrug pro 1 kb 60 sec.

### Direkte PCR aus Flüssig- oder Glycerinkultur bei *S. pneumoniae*

Aus einer wachsenden Kultur bzw. aus einer Glycerinkultur wurden 200 µl Zellen abzentrifugiert (14.000 rpm, 1 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert (modifiziert nach Müller, 2001). Davon wurden 2 µl als Template eingesetzt. Die PCR wurde sowohl mit *Taq* DNA Polymerase als auch mit iProof DNA Polymerase, und wie oben beschrieben, durchgeführt (siehe Tab. 2. 21 – Tab. 2. 24). Das entsprechende Programm wurde beibehalten bis auf den ersten Denaturierungsschritt, der auf 5 min ausgedehnt wurde.

### Kolonie-PCR bei *E. coli*

Zur Überprüfung von rekombinanten Plasmiden und zum Nachweis des IS<sub>10</sub>-R im *E. coli* Wirtstamm EPI300<sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup> wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (modifiziert nach Müller, 2001). Dabei wurde eine *E. coli* Einzelkolonie mit einem Zahnstocher gepickt, in ein PCR-tube mit entsprechendem PCR-Ansatz transferiert und an der Wand abgestrichen. Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm verlief gemäß dem oben beschriebenen



Standardprogramm für die *Taq* DNA Polymerase (siehe Tab. 2. 21 und Tab. 2. 22), mit Ausnahme des ersten Denaturierungsschritts, der auf 5 min verlängert wurde. In diesem Schritt wurden die Zellen aufgeschlossen und die DNA freigesetzt.

### Megaprime-PCR

Eine Megaprime-PCR wurde eingesetzt, um zwei oder drei einzelne PCR-Produkte in einem zusammenhängenden Fragment zu amplifizieren (modifiziert nach Müller, 2001). Mit Hilfe dieser Methode wurden z. B. Resistenzkassetten mit flankierenden Bereichen verbunden, um einen DNA-Abschnitt in einer nachfolgenden Transformation zu deletieren (siehe 2.9). Die einzelnen PCR-Produkte wurden getrennt amplifiziert, wobei die Primer an den Fusionsstellen Linkersequenzen besaßen um in der folgenden Megaprime-PCR an den entsprechenden komplementären Strang binden zu können. Wenn drei PCR-Produkte miteinander verbunden werden sollten, so besaßen nur die beiden äußeren PCR-Produkte Linkersequenzen, die zu den Enden des mittleren PCR-Produktes komplementär waren (siehe Kapitel 2.9, Abb. 2.1; Primer 2 und 5). Für die Megaprime-PCR wurden pro PCR-Produkt 25 - 50 ng (1-3 µl) gereinigte DNA eingesetzt. Zur Amplifizierung wurde iProof DNA Polymerase oder *Taq* DNA Polymerase verwendet, wobei sich der PCR-Ansatz wie in Tab. 2. 23 bzw. Tab. 2. 21 zusammensetzte. Das verwendete Programm ist in Tab. 2. 27 wiedergegeben. Zur Amplifikation wurden 'nested' Primer verwendet, die nicht am Anfang zugegeben wurden, sondern nach einem Zyklus im vierten Schritt (Tab. 2. 27).

**Tab. 2. 27: Programm einer Megaprime-PCR bei Verwendung der iProof DNA Polymerase und der *Taq* DNA Polymerase**

Schritt	iProof DNA Polymerase		<i>taq</i> DNA Polymerase	
	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1) Denaturierung	98	60	95	300
2) Annealing	60	60	55	60
3) Elongation	72	60	72	120
4) Pause: Primerzugabe	30	300	30	300
5) Denaturierung	98	60	95	240
6) Denaturierung	98	10	95	30
7) Annealing	60-66 <sup>1</sup>	20	52-60 <sup>2</sup>	30
8) Elongation	72	25/1 kb Produkt <sup>3</sup>	72	60/1 kb Produkt <sup>4</sup>
9) Terminale Elongation	72	300	72	600
10) Pause	10	∞	10	∞

Die Schritte 6) bis 8) wurden 29 Mal wiederholt.

<sup>1</sup>: Annealingtemperatur = Primerschmelztemperatur

<sup>2</sup>: Annealingtemperatur = Primerschmelztemperatur - 3 °C

<sup>3</sup>: Die Elongationszeit betrug pro 1 kb 25 sec.

<sup>4</sup>: Die Elongationszeit betrug pro 1 kb 60 sec.

### 2.7.7 Reverse Transkription

Das Enzym reverse Transkriptase synthetisiert einzelsträngige cDNA ausgehend von RNA. Dieses Enzym war eine Komponente des '1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)' (Roche, Mannheim), das in dieser Arbeit benutzt wurde. Nach Isolation der Gesamt-RNA (siehe 2.6.7) wurde die Reaktion gemäß Herstellerangaben in einem Thermocycler (T1 Thermocycler, T-Gradientcycler, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

### 2.7.8 DNA-Sequenzierung

Grundlage der DNA-Sequenzierung stellte die von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelte Methode, die auch unter „Didesoxyverfahren“ oder auch „Kettenabbruch-Verfahren“ bekannt ist, dar. Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmidinserts wurde mit Hilfe des ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V.1.1 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt. Dabei wird während der Sequenzierreaktion willkürlich statt eines 2' Desoxynukleosidtriphosphats ein fluoreszenzmarkiertes 2'3' Didesoxynukleosidtriphosphat eingebaut. Durch das eingebaute 2'3' Didesoxynukleosidtriphosphat kann die DNA-Synthese nicht fortgesetzt werden, da durch die fehlende OH-Gruppe am 3'-C-Atom keine neue Phosphodiesterbindung gebildet werden kann. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die endständig fluoreszenzmarkiert sind. Jedes Didesoxynukleosidtriphosphat ist durch einen anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in einer Kapillare durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt wird. Zur Sequenzierungsreaktion wurden PCR-Produkte (siehe 2.6.6), Plasmide und Fosmide (siehe 2.6.2) aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst, um die anschließende Reaktion nicht zu beeinflussen. Zur Sequenzierung von Fosmidinserts wurden 200 - 400 ng DNA eingesetzt, von Plasmidinserts 50 - 100 ng DNA, von PCR-Produkten 10-50 ng DNA (je nach Länge des PCR-Produktes). Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen wie in Tab. 2. 28 angegeben. Die Reaktion erfolgte in den Thermocyclern (T1 Thermocycler, T-Gradientcycler, Biometra, Göttingen) mit dem in Tab. 2. 29 aufgeführten Programm.

**Tab. 2. 28: Zusammensetzung einer Sequenzierreaktion**

Komponente	Menge [µl]
Big Dye Terminator Mix 1.1	1-2 <sup>1</sup>
Template DNA	x <sup>2</sup>
Primer (10 pmol/µl)	1
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10

<sup>1</sup>: 2 µl Big Dye Terminator Mix bei Fosmiden, ansonsten 1 µl

<sup>2</sup>: abhängig von Konzentration und Template-DNA

**Tab. 2. 29: Programm einer Sequenzierreaktion**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1) Denaturierung	96	60/180 <sup>1</sup>
2) Denaturierung	96	20
3) Annealing	50	10
4) Elongation	60	240
5) Pause	10	∞

Die Schritte 2) bis 4) wurden 24 Mal wiederholt.

<sup>1</sup>: 180 sec bei Fosmidinserts, ansonsten 60 sec.

Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktionen und die Erfassung der Sequenzdaten erfolgten durch das Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern. Über das Computerprogramm Chromas wurden die erhaltenen Sequenzen visualisiert und analysiert.

## 2.8 Erstellung und Screening von Fosmidgenbanken

Mit Hilfe des CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, USA) wurde die Erstellung einer Fosmidgenbank in *E. coli* durchgeführt. Dieses System basiert auf den Vektor CopyControl™ pCC1™ (pCC1FOS), der zwei Replikationsstarts besitzt. Der Replikationsstart *ori2* gewährleistet, dass das Plasmid ohne Induktion in einer Kopie pro Zelle vorliegt. Der Replikationsstart *oriV* bewirkt eine Erhöhung der Kopiezahl in einer Zelle, wenn das dafür benötigte *traF*-Genprodukt an den *oriV* gebunden hat. Dieses Genprodukt steht unter der Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promotors im Wirtstamm *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup> (Herstellerangaben, Wild *et al.*, 2002).

Zur Erstellung einer Fosmidgenbank wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt, die im Anschluss der Auflistung detailliert beschrieben werden:

- 1) Isolierung genomischer DNA und Scheren der DNA
- 2) 'End-Repair'-Reaktion: Auffüllen und Phosphorylierung der 5'-Enden
- 3) Größenfraktionierung durch Auftrennung in einem Low-melting Agarose Gel und Elution aus dem Gel
- 4) Ligation der Insert-DNA mit dem dephosphorylierten und linearisierten Vektor pCC1FOS
- 5) Verpackung der ligierten DNA in die 'MaxPlax Lambda Packaging Extracts'
- 6) Infektion des Wirtstammes *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup>
- 7) Selektion auf LB-Platten mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol und Inkubation für 24 - 48 h bei 37 °C
- 8) Abimpfen und Transfer der Transformanten in 250 µl LB-Medium (mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol) und Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutraum

- 9) Zugabe von 60 µl Glycerin (20%) und Lagerung bei –80 °C
- 10) Prüfung des Systems 'CopyControl™ Fosmid Library Production Kit'

Während dieser Arbeit wurden zwei Fosmidgenbanken von dem Stamm *S. pneumoniae* aR6 erstellt, wobei während der Erstellung der zweiten Genbank einige Arbeitsschritte modifiziert wurden. Diese Veränderungen werden im entsprechenden Abschnitt kurz erläutert.

1) Genomische DNA aus *S. pneumoniae* wurde nach dem beschriebenen Protokoll (siehe 2.6.1) isoliert. Gemäß Herstellerangaben sollte die DNA durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren ausreichend geschert werden. Die Kontrolle erfolgte gelelektrophoretisch durch den Vergleich der DNA-Probe mit einem mitgelieferten DNA-Marker, der die für die Ligation erforderliche Größe von 36 kb aufwies. Während der Erstellung der ersten Genbank wurde mit einem Ansatz weitergearbeitet, der 150 Mal auf- und abpipettiert wurde. Während der zweiten Genbankerstellung wurde die DNA nicht geschert, da die DNA bereits die geforderte Größe aufwies, die im Vergleich zum Größenmarker nach gelelektrophoretischer Auftrennung abgeschätzt worden war.

2) Die Enden der DNA wurden mit Hilfe des 'End-Repair'-Enzym Mix, der die Enzyme T4 DNA Polymerase und T4 Polynukleotidkinase enthielt, aufgefüllt und an den 5'-OH-Enden phosphoryliert. In diese Reaktion wurden 15-20 µg DNA eingesetzt. Die Reaktion, die gemäß Herstellerangaben angesetzt wurde, erfolgte für 45 min bei RT. Die Enzyme wurden durch 10minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert.

3) Der 'End-Repair'-Reaktionsansatz wurde auf einem Low-Melting Gel (0,75%) bei 60 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle und zur Größenorientierung wurde der mitgelieferte Größenmarker rechts und links der Proben tasche aufgetragen. Um eine UV-Bestrahlung der DNA zu vermeiden, wurde das Gel nach der Elektrophorese in drei Teile geschnitten, wobei nur die beiden äußeren Teile samt Größenmarker mit Ethidiumbromid angefärbt wurden. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und die entsprechende Größe durch eine Einkerbung markiert. Durch Aneinanderlegen der drei Gelteile konnte der entsprechende markierte Bereich identifiziert und ausgeschnitten werden.

Die DNA wurde aus dem Low-Melting Gel mit Hilfe der mitgelieferten Komponenten GELase 50X Buffer und GELase Enzyme Preparation eluiert. Anhand des Gewichtes der eluierten Gelbande wurde die Menge des benötigten GELase 50X Buffer berechnet und auf 45 °C vorgewärmt. Nach Schmelzen der Gelbande für 10 - 15 min bei 70 °C, wurde pro 100 µl Suspension 1U (1µl) GELase Enzyme Preparation zugegeben (1 mg Festagar entspricht 1 µl flüssigen Agar). Diese Lösung wurde eine Stunde bei 45 °C inkubiert. Das GELase Enzym wurde durch 10minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die Lösung wurde anschließend in

neue ERG zu je 500 µl aliquotiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10.000 rpm, 20 min, RT) wurde der Überstand abgenommen, und eine DNA-Fällung durchgeführt.

Zum Überstand wurde das 0,1fache Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und das 2,5fache Volumen an Ethanol (100% p. a.) zugegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, RT), der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit -20 °C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, RT). Nach dem Waschen wurde das Pellet ca. 10 min bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen.

Während der Erstellung der zweiten Genbank wurde die DNA weder geschert noch gelelektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt nach der End-Repair-Reaktion einer Phenolextraktion mit anschließender Fällung unterzogen (siehe 2.6.3 und 2.6.4).

4) Die gereinigte DNA wurde in eine Ligation eingesetzt, wobei die im Kit mitgelieferten Komponenten Ligase, Ligationspuffer und ATP-Lösung gemäß Herstellerangaben verwendet wurden. Der Vektor pCC1FOS ist bereits linearisiert (*Eco72I*) und dephosphoryliert mitgeliefert worden. Das optimale molare Verhältnis zwischen Insert- und Vektor-DNA wurde vom Hersteller mit 1:10 angegeben (0,009 pmol Insert-DNA, 0,09 pmol Vektor). Die Ligation erfolgte 2 h bei RT. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde bei -20 °C gelagert.

5) Das Verpacken der ligierten DNA wurde mit den 'MaxPlax Lambda Packaging Extracts' durchgeführt. Dazu wurde die DNA und ein ERG der 'MaxPlax Lambda Packaging Extracts' auf Eis aufgetaut. In jedem ERG befanden sich 50 µl 'Packaging Extract'. 25 µl aufgetautes 'Packaging Extract' wurde zu 10 µl Ligationsansatz gegeben, gemischt und 90 min bei 30 °C inkubiert. Restliches 'Packaging Extract' wurde wieder bei -80 °C eingefroren. Nach dieser Inkubationszeit wurde die zweite Hälfte des 'Packaging Extracts' zugegeben und weitere 90 min bei 30 °C inkubiert.

Bei der Erstellung der zweiten Genbank wurde auf die zweite Zugabe der 'Packaging Extracts' aufgrund der beachtlichen Ausbeute an Transformanten während der ersten Genbankerstellung verzichtet.

Anschließend wurde der Ansatz mit Phagendilutionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) auf 1 ml bzw. auf 500 µl (bei Verwendung von der halben Menge an Packaging Extract) verdünnt. Nach Zugabe von 25 µl Chloroform wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

6) Die Infektion erfolgte in den Wirtstamm *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup>. Zwei Tage vor der Infektion wurde der Wirtstamm auf einer LB-Platte ausgestrichen. Am folgenden Tag wurde eine

Kolonie gepickt. Damit wurde eine Vorkultur (LB-Medium supplementiert mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (50 ml LB-Medium supplementiert mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% Maltose) wurde mit 0,5 ml Übernachtskultur inokuliert und unter Schütteln bei 37 °C bis OD<sub>600</sub> = 0,8-1,0 inkubiert. Bis zur Infektion wurde die Kultur bei 4 °C gelagert.

Die Infektion erfolgte durch Zugabe von 10 µl unverdünnter Phagensuspension zu 100 µl *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup> und Inkubation für 20 min bei 37 °C.

7) Die ausplattierten *E. coli* wurden auf LB-Platten mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol selektioniert.

8) Nach 24 h bzw. 48 h wurden die Klone mit einem Zahnstocher gepickt und jeweils in ein mit 250 µl LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) gefülltes Well einer 96-Deep-Well-Platte transferiert. Die Platten wurden mit einer Abdeckfolie (BREATHseal™, Greiner, Frickenhausen) abgeklebt. Die Platten wurden über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

Die Anzahl der gepickten Transformanten richtete sich nach folgender Formel, die die Anzahl der benötigten Transformanten angibt, damit jede DNA-Sequenz bei einer Wahrscheinlichkeit P in der Genbank repräsentiert ist:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

(N = Anzahl der benötigten Klone, um bei einer Wahrscheinlichkeit P eine DNA-Sequenz zu finden, P = Wahrscheinlichkeit (0,9999 = 99,99%), f = Verhältnis der in einem Fosmid enthaltenen DNA-Länge zur vollständigen Genomgröße (36 kb/2039 kb))

9) Zur Konservierung wurden 60 µl Glycerin pro Well zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei – 80 °C gelagert.

Die Stämme wurden einzeln in einer Übernachtskultur (5 ml LB-Medium und 12,5 µg/ml Chloramphenicol) angezogen. Anschließend wurden sie 1:10 in LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) verdünnt und durch Zugabe einer entsprechenden Menge 1000facher Induktionslösung induziert. Die Kulturen wurden 5 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Während des Screenings der ersten Genbank wurden die Fosmide einzeln durch Plasmidisolierung präpariert (siehe 2.6.2). Anschließend wurden je 2 µl DNA von 12 Fosmiden zusammengefasst ('gepoolt'), und in *S. pneumoniae* R6 transformiert (siehe 2.5.8).

Während des Screening der zweiten Genbank wurden 24 Stämme nach 5 h Schütteln (Induktion) bei 37 °C gepoolt, indem pro Stamm 0,5 ml Kultur in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) transferiert wurde. Dieser Zellpool wurde abzentrifugiert (8000 rpm, 5 min, RT), und die Fosmide mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) isoliert, wobei das angegebene Volumen der Puffer P1, P2 und N3 verdoppelt wurde.

10) Während der Erstellung der ersten Genbank wurde das System durch Verpacken mitgelieferter Kontroll-DNA getestet. Die Kontroll-DNA (0,25 µg), die bereits gereinigt und mit glatten Enden versehen war, konnte direkt in die Ligation mit dem Vektor pCC1FOS eingesetzt werden. Die Ligation wurde durchgeführt wie unter 4) angegeben. Anschließend wurden 10 µl Ligationsansatz durch die MaxPlax Packaging Extracts verpackt wie unter 5) beschrieben. Nachdem die Phagen in Phagendilutionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt worden waren, wurde damit *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup> (OD<sub>600</sub> = 0,8 - 1,0) infiziert (siehe oben unter Punkt 6) ). Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C selektioniert. Am nächsten Tag wurde der Zelltiter errechnet, der laut Herstellerangaben bei >1 x 10<sup>7</sup> [CFU/ml] liegen sollte.

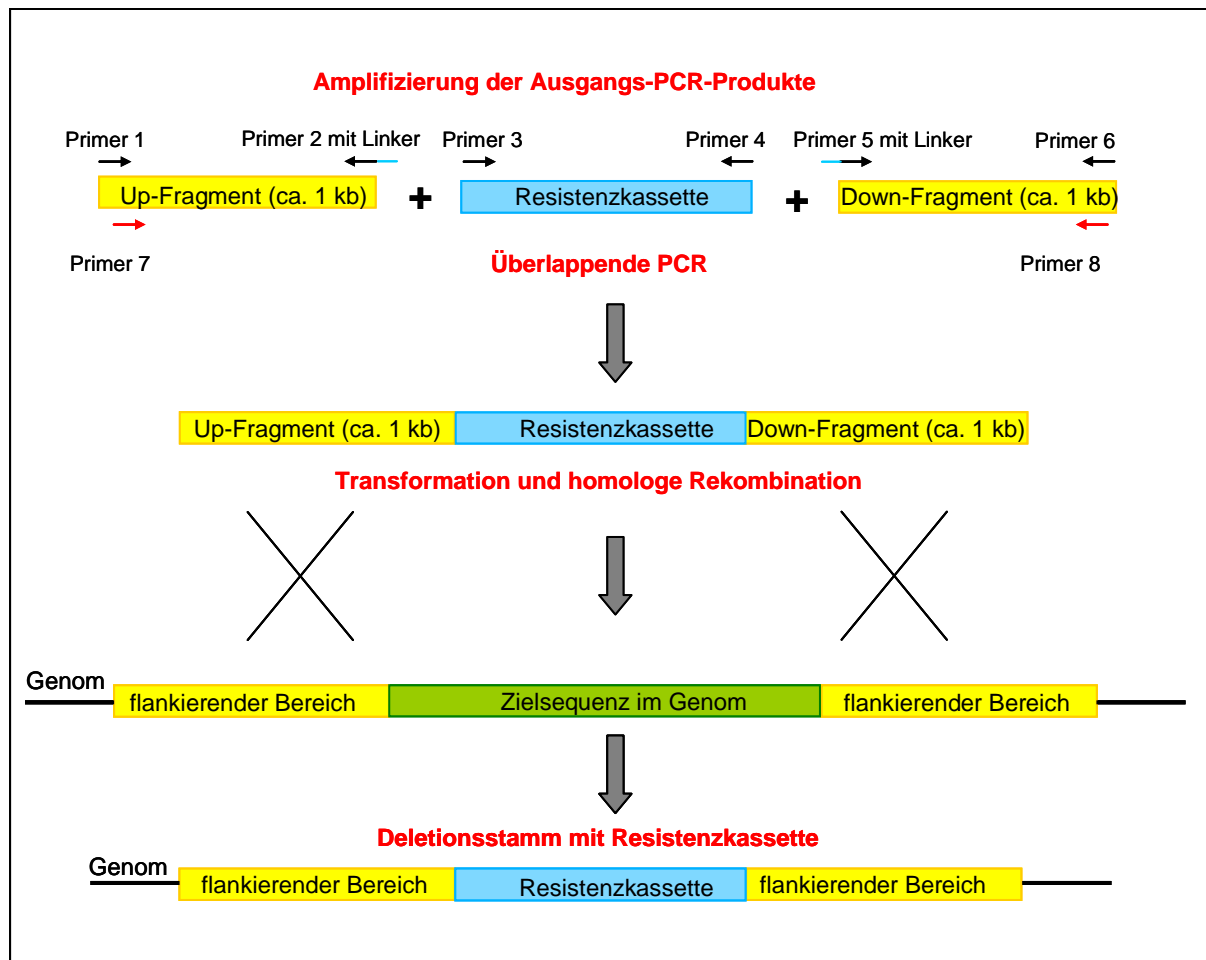
## **2.9 Durchführung von Deletionen in *S. pneumoniae* mit Hilfe von Resistenzkassetten**

Da *S. pneumoniae* natürlich kompetent ist (siehe 1.1.3), können chromosomale Modifikationen durch Transformation ohne größeren Aufwand durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Gene durch Integration einer Resistenzkassette deletiert, um aufzuklären, ob die deletierten Gene in eine Resistenz gegenüber Vancoresmycin involviert sind. Die Deletionen in *S. pneumoniae* wurden durch Transformation einer Resistenzkassette mit homologen flankierenden Bereichen erzeugt. Zum einen wurde die Janusresistenzkassette (Sung *et al.*, 2001) verwendet, und zum anderen das Kanamycinresistenz vermittelnde Gen *aphIII* (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983).

### **2.9.1 Deletion durch Integration der *aphIII*-Resistenzkassette**

Das Gen *aphIII* codiert für eine 3' 5''-Aminoglycosidphosphotransferase des Typs III, die das Antibiotikum Kanamycin durch Phosphorylierung inaktiviert. Das Gen *aphIII* wurde ohne Promotor im Leserahmen des zu deletierenden Gens bzw. Gene in das Genom integriert, so dass das Gen *aphIII* unter der Kontrolle des entsprechenden Promotors stand.

Im Folgenden wird ein allgemeines Schema zur Durchführung von Gendeletionen aufgezeigt (Abb. 2. 1). Nach diesem Schema können neben der *aphIII*-Resistenzkassette auch andere Resistenzkassetten in das Genom integriert werden, wie z. B. die Janusresistenzkassette (siehe 2.9.2).



**Abb. 2. 1: Allgemeines Schema zur Konstruktion von Gendeletionen in *S. pneumoniae* mit Hilfe von Resistenzkassetten** (Beschreibung siehe Text)

Im ersten Schritt wurden drei PCR-Produkte amplifiziert: Die ersten zwei PCR-Produkte umfassten die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Bereichs. Das Up-Fragment (etwa 1 kb), das die strangaufwärts liegende Sequenz des zu deletierenden Bereichs repräsentierte, wurde mit den Primern 1 und 2 amplifiziert. Das Down-Fragment, das die strangabwärts liegende Sequenz des zu deletierenden Bereichs repräsentierte, wurde mit den Primern 5 und 6 amplifiziert. Die Primer 2 und 5 besaßen eine Linkersequenz (ca. 26 bp), die zu den Enden der DNA-Sequenz der Resistenzkassette komplementär war. Die Resistenzkassette wurde mit den Primern 3 und 4 amplifiziert. Diese Primer besaßen keine Linkersequenzen, so dass diese universell eingesetzt werden konnten. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte (siehe 2.6.6) wurden jeweils 25-100 ng PCR-Produkt als Template-DNA in einer Megaprime-PCR eingesetzt (siehe 2.7.6). Die Zugabe von nested Primern (Primer 7 und 8) erfolgte nach dem ersten Zyklus. Das entsprechende PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines präparativen Gels aufgereinigt (siehe 2.6.5, 2.6.9), in den Rezipienten transformiert und auf das entsprechende Antibiotikum selektiert. Die Selektion der *aphIII*-Resistenzkassette erfolgte auf 100 µg/ml Kanamycin. Eine Kontrolle der Integration der



Resistenzkassette in das Genom der Transformanten erfolgte durch PCR-Amplifizierung (Primer 1 und Primer 6; gemäß Abb. 2.1) und Sequenzierung.

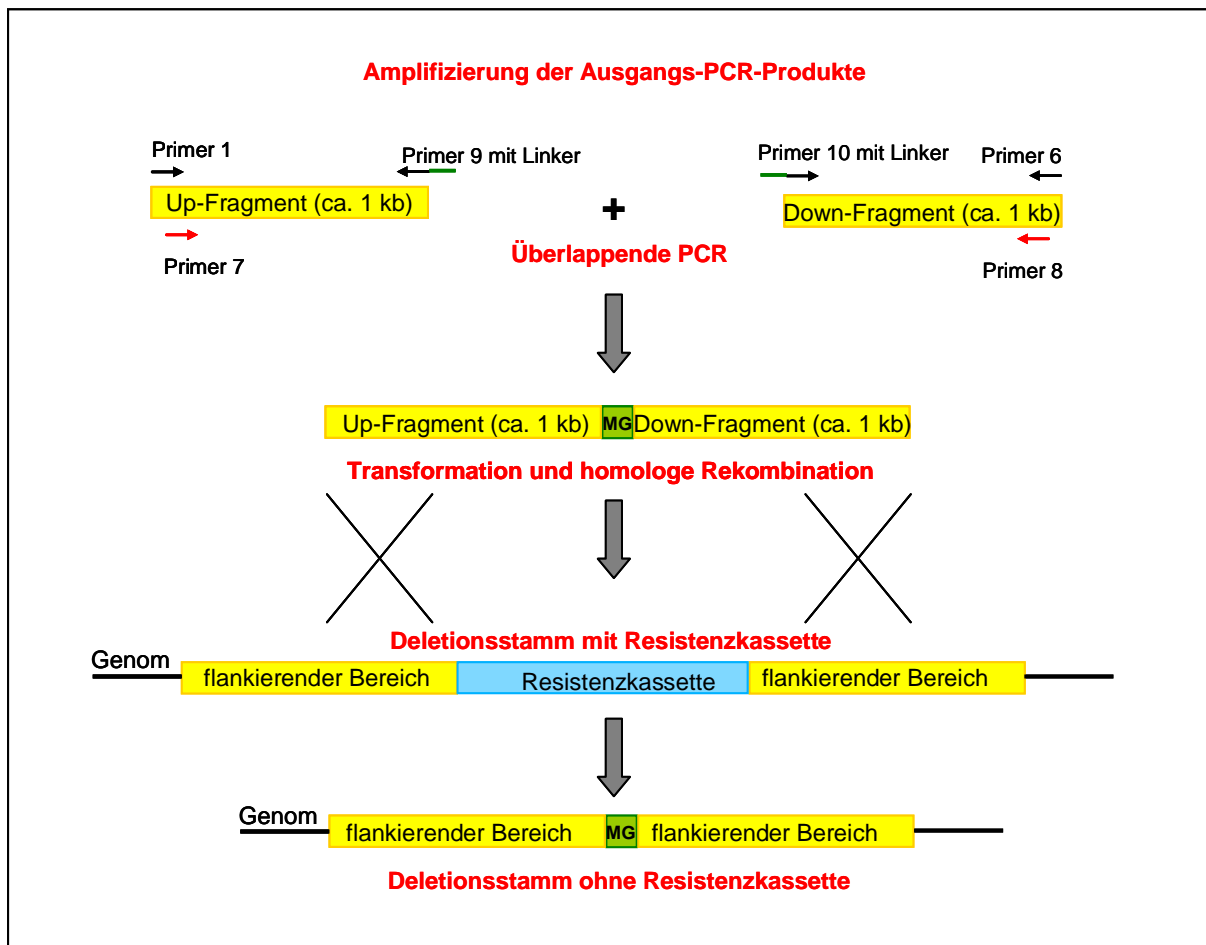
### 2.9.2 Deletion durch die Janusresistenzkassette

Durch den Einsatz von Resistenzkassetten können Gene zwar deletiert werden, aber es kann dadurch auch zur veränderten Expression der nachfolgenden Gene kommen. Aus diesem Grund wurde eine Resistenzkassette konstruiert (Sung *et al.*, 2001), die nach Deletion des gewünschten Gens in einem weiteren Transformationsschritt eliminiert werden kann. Die 1,4 kb große bicistronische Janusresistenzkassette besitzt die zwei Gene *aphIII* und *rpsL*<sup>+</sup>. *aphIII* codiert für eine 3'5"-Aminoglycosidphosphotransferase Typ III, die eine Kanamycinresistenz verleiht (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983). Das Gen *rpsL*<sup>+</sup> codiert für die Wildtypform des ribosomalen Proteins S12 (Sung *et al.*, 2001). Um die Janusresistenzkassette einsetzen zu können, muss der entsprechende Stamm als Voraussetzung eine Streptomycinresistenz aufweisen, die durch eine Punktmutation im Gen *rpsL* vermittelt wird (Sung *et al.*, 2001). Diese wurde durch Transformation eines entsprechenden PCR-Produkts erzeugt. Das PCR-Produkt, das ausgehend von dem Stamm *amiA9* mit den Primern *amiA9\_fwd1* und *amiA9\_rev1* amplifiziert wurde, wies eine Punktmutation im Gen *rpsL* auf, wodurch ein Aminosäureaustausch von L56T statt gefunden hat (Salles *et al.*, 1992). Wenn Zellen für *rpsL* heterozygot sind, so verleiht das Gen *rpsL*<sup>+</sup> dominant die Streptomycinsensitivität.

In einem ersten Transformationsschritt wurde nun das gewünschte Gen durch Integration der Janusresistenzkassette deletiert. Die Deletion wurde durchgeführt wie unter 2.9.1 beschrieben. Die Transformanten, in denen das entsprechende Gen durch die Janusresistenzkassette deletiert war, zeichneten sich durch eine Kanamycinresistenz (200 µg/ml) und eine Streptomycinsensitivität aus. Das Gen *rpsL*<sup>+</sup> verleiht Zellen, die für *rpsL* heterozygot sind, dominant eine Streptomycinsensitivität. Die Integration der Resistenzkassette wurde durch eine Kontroll-PCR bestätigt. Die Transformanten wurden anschließend mit einem weiteren PCR-Produkt transformiert, das die Janusresistenzkassette deletierte (siehe Schema Abb. 2.2). Das PCR-Produkt war so konzipiert, dass es ein sogenanntes Minigen des zuvor deletierten Gens mit flankierenden homologen Bereichen enthielt. Das Minigen bestand aus 51 bzw. 54 Nukleotiden, das in frame die Janusresistenzkassette deletierte, um die Expression der nachfolgenden Gene nicht zu beeinflussen. Die Ausgangs-PCR-Produkte, das Up- und Down-Fragment, wurden mit den Primern 1 und 9 bzw. 10 und 6 amplifiziert, wobei die Primer 9 und 10 mit Linkersequenzen versehen waren. Diese beiden Primer waren zueinander komplementär. In einer Megaprime-PCR (siehe 2.7.6) wurden das aufgereinigte Up- und Down-Fragment miteinander verbunden, wobei die 'nested' Primer 7 und 8 verwendet wurden. Bei den

Primern 1, 6, 7 und 8 handelte es sich um die gleichen Primer, die in der Amplifikation des ersten Megaprime-PCR-Produktes eingesetzt wurden (Abb. 2.1).

Das PCR-Produkt wurde in den entsprechenden Rezipienten transformiert und auf 200 µg/ml Streptomycin selektioniert. Nach Verlust der Janusresistenzkassette wurden die Transformanten sensitiv gegenüber Kanamycin und resistent gegenüber Streptomycin. Die Transformanten wurden durch PCR-Amplifikation (Primer 1 und Primer 6; gemäß Abb. 2.2) und Sequenzierung überprüft.



**Abb. 2. 2: Allgemeines Schema zur Eliminierung der Janusresistenzkassette in *S. pneumoniae*** (Beschreibung siehe Text; MG: Minigen)

### 2.9.3 Übersicht über die Konstruktion von Deletionsstämmen

In den nachfolgenden Tabellen (Tab. 2. 30, Tab. 2. 31) wird die Konstruktion der Deletionsstämmen, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, aufgezeigt. Es werden die dazu benutzten Primer und die verwendete Resistenzkassette aufgeführt. In Tab. 2. 31 werden zudem die Primer und PCR-Produkte angegeben, die zur Deletion der Janusresistenzkassette verwendet wurden.

**Tab. 2. 30: Deletion durch Integration einer Resistenzkassette**

Die Deletion des jeweiligen Genes bzw. Gene wurde durch Transformation eines Megaprime-PCR-Produktes des angegebenen Ausgangsstammes durchgeführt. Die Bezeichnungen der konstruierten Stämme sowie die Gene, die deletiert wurden, sind angegeben. In Spalte drei und vier werden die jeweiligen Primer zur Amplifizierung des Up- und Down-Fragmentes angegeben. Anschließend werden die Primer aufgelistet, die zur Amplifizierung des Megaprime-PCR-Produktes verwendet wurden.

Ausgangs-stamm	Stamm-bezeichnung	Deletierte Gene	Resistenz-kassette	Primer: Resistenz-kassette	Primer: up-Fragment	Primer: down-Fragment	Primer: überlappendes PCR-Produkt
R6	R6ΔABC	orf1, spr0812, spr0813	aphIII	aphIII_fwd aphIII_rev	spr0812_up1, Proof1_Kanlink_rev	spr0812_down3 ko-TR_aphIII_fwd	spr0812_up2 spr0812_down4
gR6	gR6ΔABC	orf1, spr0812, spr0813	aphIII	aphIII_fwd aphIII_rev	spr0812_up1, Proof1_Kanlink_rev	spr0812_down3 ko-TR_aphIII_fwd	spr0812_up2 spr0812_down4
gTR	gTRΔABC	orf1, spr0812, spr0813	aphIII	aphIII_fwd aphIII_rev	spr0812_up1, Proof1_Kanlink_rev	spr0812_down3 ko-TR_aphIII_fwd	spr0812_up2 spr0812_down4
R6_Str <sup>R</sup>	R6ΔdexS_aphIII- rpsL <sup>+</sup>	dexS	Janus	Janus_f Janus_r	dexS_up2 dexS_rev1_JanusLinker	dexS_down1 dexS_fwd1_JanusLink	dexS_up1 dexS_down2
aR6_Str <sup>R</sup>	aR6Δcopy_aphIII- rpsL <sup>+</sup>	copy	Janus	Janus_f Janus_r	cop_up1 copYrev_JanusLinker	copy_down1 copYfwd_JanusLink	cop_up2 copY_down2
eR6_Str <sup>R</sup>	eR6Δcopy_aphIII- rpsL <sup>+</sup>	copy	Janus	Janus_f Janus_r	cop_up1 copYrev_JanusLinker	copy_down1 copYfwd_JanusLink	cop_up2 copY_down2
fR6_Str <sup>R</sup>	fR6Δcopy_aphIII- rpsL <sup>+</sup>	copy	Janus	Janus_f Janus_r	cop_up1 copYrev_JanusLinker	copy_down1 copYfwd_JanusLink	cop_up2 copY_down2

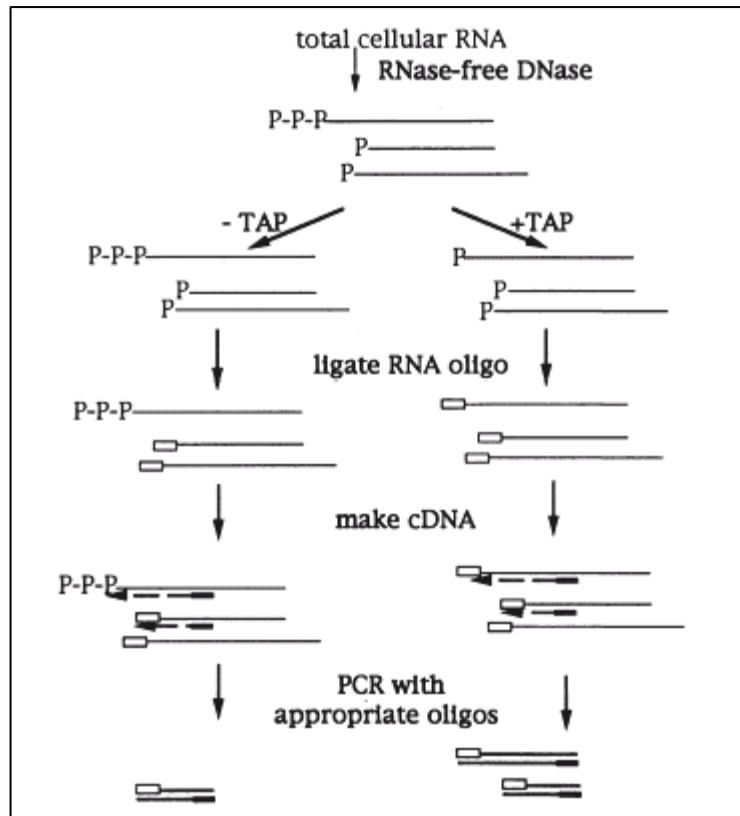
**Tab. 2. 31: Deletion der Janusresistenzkassette durch Integration eines Minigens**

Nach Integration der Januskassette und Deletion des entsprechenden Genes (siehe Tab. 2.30), wurde die Janusresistenzkassette durch Integration eines Minigens (Spalte 3) eliminiert. Dazu wurde der Ausgangsstamm (Spalte 1) mit einem Megaprime-PCR-Produkt transformiert, das mit den in Spalte fünf angegebenen Primern amplifiziert worden war. Zur Amplifizierung des Megaprime-PCR-Produktes dienen das Up- und das Down-Fragment als Template, die zuvor mit den angegebenen Primern (Spalte 4 bzw. 5) amplifiziert worden waren. Die Stammbezeichnung des neukonstruierten Stammes ist in Spalte 2 aufgeführt.

Ausgangs-stamm	Stamm-bezeichnung	Minigen	Primer: up-Fragment	Primer: down-Fragment	Primer: Megaprime-PCR-Produkt
R6 $\Delta$ <i>dexS_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	R6 $\Delta$ <i>dexS</i>	<i>dexS</i> *	<i>dexS_up2</i> Minigen_ <i>dexS</i> rev	<i>dexS_down1</i> Minigen_ <i>dexS</i> fwd	<i>dexS_up1</i> <i>dexS_down2</i>
aR6 $\Delta$ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	aR6 $\Delta$ <i>copY</i>	<i>copY</i> *	<i>cop_up1</i> Minigen_ <i>copY</i> -rev	<i>copY_down1</i> Minigen_ <i>copY</i> _fwd	<i>cop_up2</i> <i>copY_down2</i>
eR6 $\Delta$ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	eR6 $\Delta$ <i>copY</i>	<i>copY</i> *	<i>cop_up1</i> Minigen_ <i>copY</i> -rev	<i>copY_down1</i> Minigen_ <i>copY</i> _fwd	<i>cop_up2</i> <i>copY_down2</i>
fR6 $\Delta$ <i>copY_aphIII-rpsL</i> <sup>+</sup>	fR6 $\Delta$ <i>copY</i>	<i>copY</i> *	<i>cop_up1</i> Minigen_ <i>copY</i> -rev	<i>copY_down1</i> Minigen_ <i>copY</i> _fwd	<i>cop_up2</i> <i>copY_down2</i>

## 2.10 Bestimmung des Transkriptionsstartes durch 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Um den Transkriptionsstart durch 5' RACE zu bestimmen, sind verschiedene Schritte notwendig, die in Abb. 2. 3 schematisch aufgezeigt werden (Bensing *et al.*, 1996; Schäfer, 1995; Halfmann *et al.*, 2007b). Im Anschluss an Abb. 2. 3 wird die Durchführung der einzelnen Schritte detailliert beschrieben. Nach Isolierung von Gesamt-RNA (siehe 2.6.7), wird eine RNA-Probe einer TAP (tobacco acid pyrophosphatase) -Behandlung unterzogen, eine zweite bleibt unbehandelt. Anschließend wird ein RNA-Oligonukleotid an die 5' Monophosphatenden der RNA ligiert. Die RNA wird unter Verwendung eines genspezifischen Primers in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe eines oligonukleotidspezifischen und eines genspezifischen Primers wird ein PCR-Produkt amplifiziert, das anschließend zur Bestimmung des Transkriptionsstartes sequenziert wird.



**Abb. 2. 3: Vorgehensweise zur Bestimmung des Transkriptionsstartes durch 5' RACE**

(Abb. aus Bensing *et al.*, 1996), (Beschreibung siehe Text)

### TAP-Behandlung

15 µg Gesamt-RNA wurden einer TAP-Behandlung (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, USA) unterzogen. Ein weiterer Ansatz, der nicht mit TAP behandelt wurde, diente als Negativkontrolle. In den nachfolgenden Schritten wurde die Negativkontrolle genauso behandelt wie der eigentliche Ansatz. Bevor die Komponenten zusammen pipettiert wurden (Tab. 2. 32), wurde die RNA-Lösung 5 min bei 55 °C inkubiert. Die TAP-Behandlung erfolgte 60 min bei 37 °C.

**Tab. 2. 32: Zusammensetzung der TAP-Reaktion**

Komponente	Menge [µl]	
	Probe	Negativkontrolle
RNA (15 µg)	x <sup>1</sup>	x <sup>1</sup>
SUPERaseIN (20 U/µl)	2	2
10fach TAP-Puffer	5	5
TAP (10 U/µl)	2,5	--
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50	ad 50

<sup>1</sup>: entsprechendes Volumen für 15 µg RNA

### Phenol-Chloroform-Extraktion

Anschließend wurden die Proben einer modifizierten Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Der Ansatz wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform (1:1; äquiliert mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) wurde der Ansatz 30 sec gevortext und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, RT). Die Oberphase wurde in ein neues ERG transferiert. Durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 800 µl eiskaltem Ethanol (100%, p. a.), 10 minütiger Inkubation bei -20 °C und Zentrifugation (14.000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde die RNA präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Pellet mit 200 µl Ethanol (70%, in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt) gewaschen und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet 10 min bei 55 °C getrocknet und in 55 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Ligation des RNA-Oligonukleotids

Im folgenden Schritt wurde ein RNA-Oligonukleotid an die RNA ligiert. Das RNA-Oligonukleotid "RACE" wurde von der Firma biomers.net (Ulm) synthetisiert und besaß folgende Sequenz: 5' GAU AUG CGC GAA UUC CUG UAG AAC GAA CAC UAG AAG AAA 3'. Die RNA wurde 5 min bei 55 °C inkubiert und anschließend mit 5 µl RNA-Oligo „Race“ (= 500 pmol) gemischt. Nach Zugabe des RNA-Oligonukleotids wurden die Ansätze 5 min bei 95 °C und danach ca. 2 min auf Eis inkubiert. Die Ligationsansätze wurden zusammen pipettiert (Tab. 2. 33), gemischt und über Nacht bei 18 °C inkubiert.

**Tab. 2. 33: Ligationsansatz des RNA-Oligonukleotids**

Komponente	Menge [µl]	
	Probe	Negativkontrolle
RNA (15 µg)	55	55
RNA-Oligonukleotid (500 pmol)	5	5
T4 RNA-Ligase (20 U/µl)	5	5
10fach RNA Ligase Puffer	10	10
SUPERaseIN (20 U/µl)	4	4
DEPC-H <sub>2</sub> O	21	21

Bevor die Ligationsansätze in einer reversen Transkription eingesetzt wurden, wurden sie einer Phenol-Chloroform-Extraktion nach obigen Protokoll unterzogen. Die Pellets wurden in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit dem 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Mannheim) gemäß Herstellerangaben durchgeführt (siehe 2.7.7). Für die Reaktion

wurden 8,2  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung (entspricht 2,5  $\mu\text{g}$ ) als Template und 2  $\mu\text{l}$  genspezifischer Primer (1 pmol/ $\mu\text{l}$ ) eingesetzt.

### PCR-Amplifikation

Die synthetisierte cDNA aus dem vorangegangenen Schritt diente direkt als Template für die folgende PCR. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe der *Taq* DNA Polymerase amplifiziert. Der Ansatz setzte sich zusammen wie in Tab. 2. 34 aufgeführt. Zur Amplifikation wurde ein RNA-Oligonukleotid spezifischer Primer (RACE-PCR\_5) und ein genspezifischer Primer eingesetzt. Dieser Primer lag etwas versetzt zu dem in der reversen Transkription verwendeten Primer ('nested Primer'). Die Reaktion wurde nach dem angegebenen Programm (Tab. 2. 35) durchgeführt. Mit der Negativkontrolle wurde ebenso verfahren wie mit der Probe. Allerdings sollte hier kein PCR-Produkt entstehen, da durch die fehlende TAP-Behandlung keine Ligation mit dem RNA-Oligonukleotid stattfinden konnte.

**Tab. 2. 34: PCR-Ansatz zur Transkriptionsstartbestimmung**

Komponente	Menge [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration
10fach Puffer	10	1x
dNTPs (10 mM)	2,5	0,25 mM
sense-Primer <sup>1</sup> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2,5	0,25 pmol/ $\mu\text{l}$
antisense-Primer <sup>2</sup> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2,5	0,25 pmol/ $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8	2 mM
cDNA	10	
Red Goldstar <i>Taq</i> <sup>TM</sup> DNA Polymerase	1	0,05 U/ $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100	

<sup>1</sup>: nested genspezifischer Primer

<sup>2</sup>: RNA-Oligonukleotid spezifischer Primer (RACE-PCR\_5)

**Tab. 2. 35: PCR-Programm zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1) Denaturierung	95	600
2) Denaturierung	95	30
3) Annealing	46	40
4) Elongation	72	40
5) terminale Elongation	72	600
6) Pause	10	$\infty$

Die Schritte 2) - 4) wurden 39 Mal wiederholt.

Auf einem 2%igen TEE-Agarosegel wurde die Amplifikation der PCR-Produkte überprüft, indem jeweils 10  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt wurden. Wurde auf dem Gel eine Bande identifiziert, so wurde das PCR-Produkt

aufgereinigt und sequenziert. Wurde auf dem Gel eine Doppelbande sichtbar, so wurde die DNA aus dem Gel eluiert (siehe 2.6.5) und in den Vektor pUC19 kloniert. Nach Transformation in *E. coli* wurden verschiedene Plasmide isoliert und deren Inserts sequenziert.

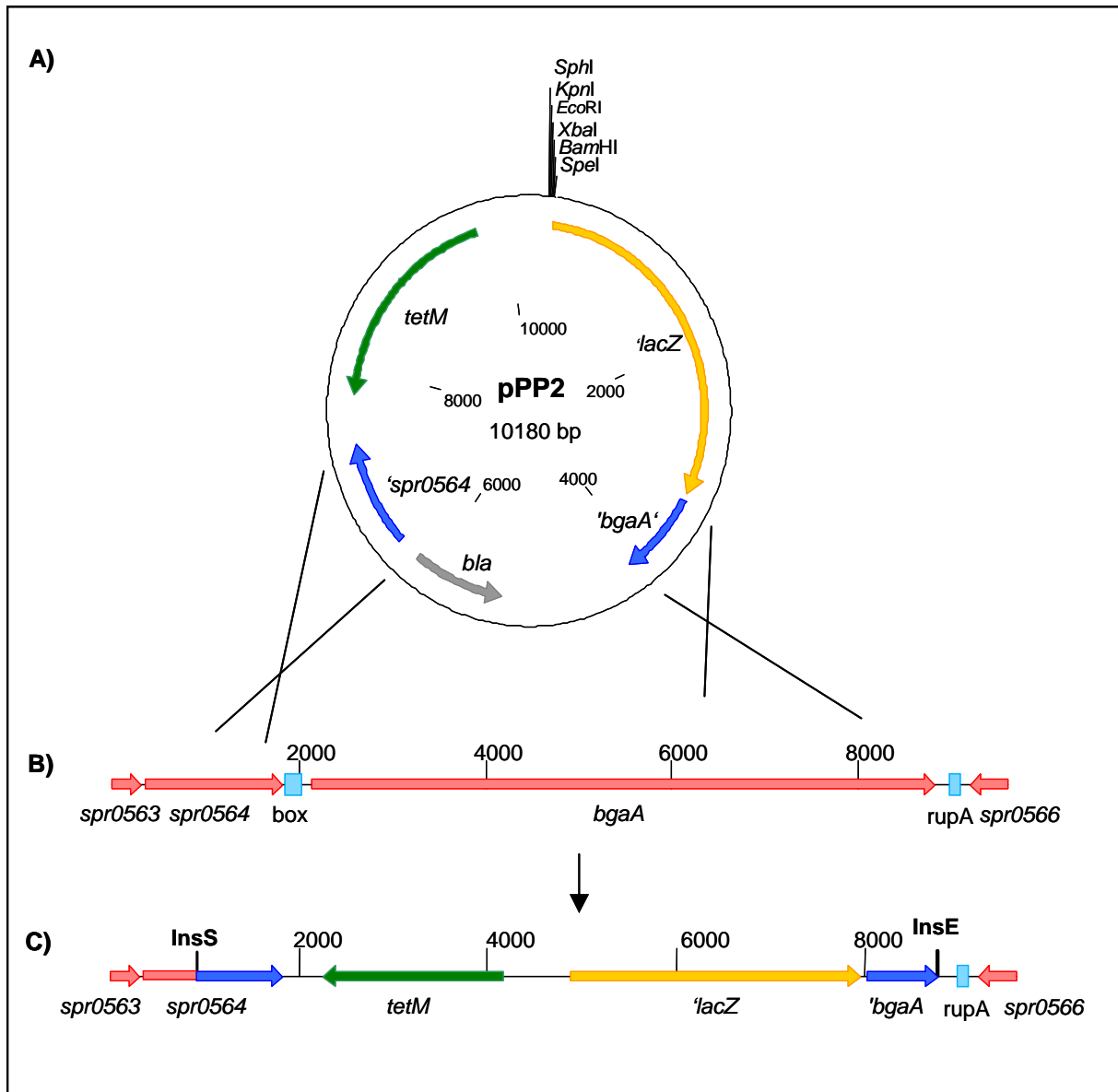
Die Sequenzierung (siehe 2.7.8) wurde durchgeführt unter Verwendung des in der PCR eingesetzten genspezifischen Primers. An der Ligationsstelle zwischen RACE-Oligonukleotid und spezifischer *S. pneumoniae* Sequenz gibt die erste Base nach dem RACE-Oligonukleotid den Transkriptionsstart +1 an.

### 2.11 $\beta$ -Galaktosidaseassay

Zur Aktivitätsbestimmung von Promotoren in *S. pneumoniae* wurden  $\beta$ -Galaktosidaseassays durchgeführt. Dieser Assay basiert auf dem Miller-Assay (Miller, 1972), in dem das chromogene Substrat o-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase in Galaktose und o-Nitrophenol (ONP) gespalten wird. Das freigesetzte ONP kann durch seine gelbe Färbung photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden, wobei der Messwert ein Maß für die Konzentration der  $\beta$ -Galaktosidase im Reaktionsansatz ist.

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Promotoraktivität das in *S. pneumoniae* integrative Plasmid pPP2 verwendet (Abb. 2. 4; Halfmann *et al.*, 2007a). Der zu untersuchende Promotor wurde vor das promotorlose *lacZ* kloniert und in *S. pneumoniae* transformiert. Über ein Doppel-Crossover integriert das hergestellte Reporterkonstrukt in das Genom von *S. pneumoniae* (Abb. 2. 4). Ausgehend von diesen Transformanten wurde die Aktivität des Promotors gemessen. Dabei hängt die als spezifische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität messbare Expression von der Stärke des klonierten Promotors ab.





**Abb. 2. 4: Integration des pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae***

A) Genkarte des pPP2

B) Genetische Organisation der *bgaA*-Region in *S. pneumoniae*

C) Genetische Organisation der *bgaA*-Region in *S. pneumoniae* nach Integration des pPP2

(*tetM*: Tetracyclinresistenz; *'lacZ'*:  $\beta$ -Galaktosidase; *'bgaA'*: endogene  $\beta$ -Galaktosidase; *bla*: Ampicillinresistenz; *spr0564*: Phosphotransferasesystem; *rupA* und *box*: repetitive Elemente; *InsS* und *InsE*: Start und Ende der Integrationsstelle)

Eine Vorkultur wurde in 6 ml C-Medium mit 100  $\mu$ l aufgetauter Glycerindauerkultur angeimpft und bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. In der spätexponentiellen Phase (ca. N = 80) wurde davon 0,5 ml Kultur in 9,5 ml vorgewärmtes C-Medium überimpft und bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. Wenn die Kultur die spätexponentielle Wachstumsphase erreichte, so wurden 2 ml Kultur entnommen und abzentrifugiert (14.000 rpm, 2 min, RT). Der Überstand wurde vollständig entfernt, und das Zellpellet in 0,5 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden bei 37  $^{\circ}$ C bis zur vollständigen Zelllyse inkubiert (ca. 5 min) und anschließend bis zur Messung auf Eis

gestellt. Für den Assay wurden 200 µl Zellextrakt in eine Küvette transferiert und 5 min im 30 °C vorgewärmten Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments, Großzimmern) inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl auf 30 °C vorgewärmte ONPG-Lösung (1 mg/ml, frisch angesetzt) setzte die Reaktion ein. Die für den β-Galaktosidaseassay verwendeten Reagenzien sind in Tab. 2. 36 aufgeführt.

Die Absorptionsmessung wurde als Kinetik bei einer Wellenlänge von 420 nm 15 min lang in einem Messintervall von 30 sec durchgeführt. Als Nullwert diente ein Ansatz aus 200 µl Lysepuffer und 800 µl ONPG-Lösung.

Aus dem linearen Bereich des Absorptions-Zeit-Graphen wurde die Steigung abgelesen, die in die folgende Formel eingesetzt wurde. Um die Promotorstärke berechnen zu können, musste außerdem die Gesamt-Proteinkonzentration im Zellysate durch Bradfordbestimmung ermittelt werden (siehe 2.12).

$$\text{spezifische } \beta\text{-Galaktosidaseaktivität } U \left[ \frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right] = \frac{s \times V}{\epsilon \times d \times m}$$

(s = Steigung des Absorptions-Zeit-Graphen =  $\Delta OD_{420} / \Delta t$  [1/min], V = Reaktionsvolumen = 1 ml,  $\epsilon$  = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm =  $4,5 \cdot 10^3$  [l/mol\*cm], D = Lichtweg = Küvettendicke = 1 cm, m = Masse des Proteins im Reaktionsansatz [mg]; U = Units)

**Tab. 2. 36: Reagenzien zur Durchführung des β-Galaktosidaseassays**

Komponente	Konzentration/ Menge
<b>Z-Puffer</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mmol
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46 mmol
MgSO <sub>4</sub>	1 mmol
β-Mercaptoethanol	2,7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
pH 7, Lagerung bei 4 °C	
<b>Lysepuffer</b>	
Z-Puffer supplementiert mit Triton-X-100	0,05%
Lagerung bei 4 °C	
<b>ONPG-Lösung</b>	
ONPG gelöst in Z-Puffer	1 mg/ml
immer frisch angesetzt	

## 2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in Zellextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet im stark sauren Milieu an vorhandene Proteine, wobei das Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm kann die Proteinmenge im Vergleich zum Nullwert bestimmt werden, da die Intensität des Farbkomplexes ein Maß für die vorhandene Proteinmenge darstellt.

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge der unter 2.11 hergestellten Zellysate wurde mit Hilfe des kommerziell erworbenen Rotiquant (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl des Zellysats 1:10 in Z-Puffer in einem ERG verdünnt, um das den Bradford-Assay störende Triton-X-100 zu reduzieren. Dann wurde eine Mischung aus 200 µl Rotiquant und 700 µl Z-Puffer zum Ansatz gegeben, gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde in eine Einmalküvette transferiert und die OD<sub>595</sub> in einem Photometer (Uvikon922 Spectrophotometer, Kontron Instruments, Groß-Zimmern) gemessen. Anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade (Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis 8 µg/ml) konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

## 2.13 Mikroarraybasierte Transkriptomanalyse

Die Durchführung von mikroarraybasierten Transkriptomanalysen beinhaltet fünf Arbeitsschritte, die im Folgenden detailliert beschrieben werden: Herstellung der Biochips, Herstellung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe, Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe, Einscannen des Biochips und Datenauswertung. Die in dieser Arbeit beschriebene Vorgehensweise zur Durchführung von mikroarraybasierten Transkriptomanalysen wurde vor allem von Dr. Manuel Heintz (Dissertation, 2006) und Dr. Patrick Maurer in dieser Arbeitsgruppe etabliert. Ein Mikroarrayexperiment wurde mindestens zweimal durchgeführt, wobei ein Experiment aus zwei Einzelarrays mit DyeSwap bestand. Unter Dyeswap versteht man die umgekehrte Fluoreszenzmarkierung der beiden zu vergleichenden Proben.

### 2.13.1 Das *S. pneumoniae* R6 Oligonukleotid-Set

Um *S. pneumoniae* R6 Stämme auf Transkriptomebene vergleichen zu können, wurde auf ein *S. pneumoniae* R6 Oligonukleotid-Set von MWG Biotech AG, Ebersberg, zurück gegriffen. Dieses Oligonukleotid-Set setzte sich aus 2018 genspezifischen und drei Arabidopsis-spezifischen 50mer-Oligonukleotide zusammen. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten gab es für 28 der 2046 annotierten orfs keine Oligonukleotide (Hoskins *et al.*, 2001). Jedes Gen war durch zwei identische Oligonukleotide auf dem Biochip

vertreten. Die Arabidopsis-spezifischen Oligonukleotide dienten als Negativkontrolle und waren je zehn Mal zufällig in den Mikrotiterplatten bzw. auf dem Chip verteilt. Intergenische Regionen waren nicht abgedeckt.

Am 5'-Ende der Oligonukleotide befand sich ein Amino-C6-Linker, der als reaktive Gruppe auf Epoxy-Slides fungierte, wodurch in einem wässrigen Milieu kovalente Iminbindungen gebildet wurden.

Die Oligonukleotide wurden in 28 µl 3 x SSC + 1,5 M Betain (0,45 M NaCl, 45 mM Na-Citrat, pH7, 1,5 M Betain) gelöst, so dass die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 50 µM vorlagen. Die Oligonukleotide waren auf sechs Mikrotiterplatten verteilt, wobei die sechste Mikrotiterplatte zu zwei Drittel mit Puffer gefüllt war. Während des Spottingprozesses wurde diese Platte als vierte Platte gespottet, so dass die Puffer-Spots nicht am Ende eines jeden Subarrays waren. Die Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgte, abgedeckt mit einer Adhäsionsfolie, bei -20 °C.

### **2.13.2 Herstellung der Biochips**

Mit Hilfe des SpotArray™<sup>24</sup> Microarray Spotting System (Perkin Elmer, Wellesley, USA) wurden die Oligonukleotide auf NexterionR Slides E (Schott AG, Mainz) gespottet. Dabei wurde ein Kontaktverfahren angewandt, das auf direktem Oberflächenkontakt beruht. Durch einen Printkopf, der 32 Mikrospotting-Pins (SMP3-Pins, Telchem, Sunnyvale, USA) enthielt, wurden die Oligonukleotide von der Mikrotiterplatte auf die Glasslides transferiert. Durch ein XYZ-Bewegungskontrollsystem wurden die exakten Positionen des Transfers garantiert. In der dazugehörigen Software SpotArray™ wurden die von MWG Biotech AG, Ebersberg, gekauften, mit Oligonukleotiden bestückten Mikrotiterplatten definiert, so dass letztlich jeder Spot einem Oligonukleotid zugeordnet werden konnte. Diese Zuordnung wurde unter dem sogenannten gal.file gespeichert.

Bevor die Slides in den Spotter gelegt wurden, wurden sie mit einem Diamantschreiber beschriftet und mit einer Druckluftvorrichtung von Staubpartikeln gereinigt. Kommerzielle Objektträger, die mit Ethanol abgewischt und mit Druckluft getrocknet wurden, dienten als Blockingslides. Auf diesen Blockingslides erfolgte der erste Spot nach Aufnahme der Oligonukleotidlösung in die Pins. Dadurch wurde die an der Pin Spitze haftende Flüssigkeit entfernt, um zu vermeiden, dass die ersten Spots größere Durchmesser aufwiesen als die danach gespotteten. Die Mikrotiterplatten wurden ca. 10 min bei RT aufgetaut, abzentrifugiert (800 x g, 2 min, RT) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Das Spottingprotokoll war so konzipiert, dass immer nur aus zwei Mikrotiterplatten die Slides bespottet wurden, um die Verdunstung aus den Mikrotiterplatten so gering wie möglich zu halten. Die Pins wurden vor jedem Spotting-Prozess automatisch in der Waschanlage mit

Reinstwasser (GenPure-Wasseraufbereitungsanlage, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert) durchgespült (Einstellungen: neun sec Waschvorgang, fünf Wiederholungen des Waschvorgangs, und vier sec Trocknungszeit). Folgende Einstellungen wurden im verwendeten Spotting Protokoll gewählt (Tab. 2. 37).

**Tab. 2. 37: Einstellungen des verwendeten Spotting Protokolls**

Auswahlposition	Einstellung
Number of plates per plate change	2
Read barcodes on plates	No
Read barcodes on substrates	No
Number of pre-prints after each sample load	10
Pre-print spot spacing, center to center [ $\mu\text{m}$ ]	500
Number of times to print each spot within array	2
Nominal spot diameter [ $\mu\text{m}$ ]	150
Spot spacing, center to center [ $\mu\text{m}$ ]	345
Location on array on substrate	Center
Leave space for a barcode/label at bottom	Yes
Printing approach velocity [mm/s]	10
Printing departure velocity [mm/s]	10
Printing overtravel [ $\mu\text{m}$ ]	0
Printing dwell time [ms]	400
Sample load overtravel [ $\mu\text{m}$ ]	100
Sample load dwell time [ $\mu\text{m}$ ]	2500
Substrate thickness [mm]	1.1
Maximum number of spots per sample load	120
Speed of printhead X-Y motion	Fast
Length of wash procedure [s]	6
Number of times to wash	4
Length of dry procedure after washing [s]	3
Do not print when humidity is outside of acceptable range	Yes
Minimum acceptable humidity [%RH]	50
Maximum acceptable humidity [%RH]	70
Control humidity level during printing procedure	Yes
Target humidity level [%RH]	65
Do not print when temperature is outside of acceptable	No

RH = Relative Humidity

Nach Beendigung des Spottens wurden die Slides 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend eine Stunde bei 85 °C gebacken. Die Biochips, die bis zu einem Jahr gelagert werden können, wurden bis zur Verwendung trocken und dunkel bei RT aufbewahrt.

### 2.13.3 Markierung der Hybridisierungsprobe

Die RNA-Proben wurden mit Hilfe des LabelStar™ Array Kit (Qiagen, Hilden) und den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 (PerkinElmer, Wellesley, USA) markiert. Die Markierung erfolgte durch Umschreiben der RNA in cDNA und dem gleichzeitigen Einbau von Cy3-dCTP- bzw. Cy5-dCTP-Fluoreszenzfarbstoffen.

Die RNA wurde, wie unter 2.6.7 beschrieben, isoliert und durch Zugabe von DEPC-H<sub>2</sub>O bzw. durch Aufkonzentration in einer SpeedVac auf eine Konzentration von 3 µg/µl eingestellt. Die RNA wurde in zwei Ansätzen zum einen mit Cy3 und zum anderen mit Cy5 markiert, um einen DyeSwap durchzuführen. Die Reaktion wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C, in Alufolie verpackt, inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben mit Hilfe der im Kit enthaltenen Aufreinigungssäulen, gemäß Herstellerangaben, aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch zweimalige Zugabe von 15 µl EB-Puffer.

Anschließend wurden die Ansätze durch die SpeedVac im Dunkeln vollständig eingetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Pellets bei –20 °C gelagert.

### 2.13.4 Hybridisierung der Probe auf Biochips

Die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben wurde maschinell mit einer Hybridisierungsmaschine (Tecan HS400, Crailsheim) nach dem unten angegebenen Protokoll (Tab. 2. 39) durchgeführt.

Die cDNA-Proben wurden jeweils in 55 µl Hybridisierungspuffer (Tab. 2. 38) aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Cy3-markierte Probe mit der entsprechenden Cy5-markierten Probe gemischt und im Probeninjektionsschritt auf die Biochips appliziert. Nach der Hybridisierung wurde der Biochip aus der Hybridisierungsmaschine genommen und bis zum Einscannen in einer dunklen Dose bei RT aufbewahrt.

**Tab. 2. 38: Zusammensetzung der Hybridisierungspuffer**

Komponente	Reagentien, Menge/Konzentration
Hybridisierungspuffer	Nexterion® Hyb (Schott, Jena) mit Formamid (1:2) gemischt
Prähybridisierungspuffer	4 x SSC, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml
0,1% SDS	10 ml 10%ige SDS-Lösung: H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1 l
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH7
0,1% SDS, 2 x SSC	10 ml 10%ige SDS-Lösung und 100 ml 20 x SSC-Lösung: H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1 l
1 x SSC	50 ml 20 x SSC-Lösung: H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1 l

**Tab. 2. 39: Hybridisierungsprotokoll**

Komponente	Waschzeit [min]	Inkubationszeit [min]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
0,1% SDS	0,5	0,5	25	--
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	0,5	--	25	--
Prähybridisierungspuffer	0,5	30	42	--
Prähybridisierungspuffer	0,5	--	40	--
Probeninjektion			40	--
Hybridisierung; Temperatur: 40 °C; Bewegungsfrequenz: mittel; Zeit: 16 h				
2 x SSC, 0,1% SDS	1	0,5	30	1
1 x SSC	1	0,5	30	1
0,1 x SSC	1	0,5	30	--
Slidetrocknung; Temperatur: 30 °C; Zeit: 3 Min				

### 2.13.5 Einscannen der Biochips und Erfassung der Bilddaten

Das Einscannen der Biochips erfolgte durch das ScanArray<sup>®</sup>4000 Microarray Analysis System (PerkinElmer, Wellesley, USA). Der Biochip wurde in das Scangerät eingezogen und nacheinander von zwei Lasern verschiedener Wellenlänge (611 nm, 547 nm) abgescannt. Ein Laser diente zur Anregung der Cy3 markierten Probe, der andere zur Anregung der Cy5 markierten Probe. Mit Hilfe des Computerprogramms ScanArray<sup>®</sup>Express Software, Version 2.1 und dem Programmunterpunkt EasyScan konnten die Fluoreszenzen visualisiert und Feinabstimmungen getätigt werden. Im ersten Scanprozess wurde eine Auflösung von 50 µm gewählt, um die Photomultiplier Tube (PMT)-Stärke so zu justieren, dass beide Fluoreszenzkanäle ungefähr die gleichen Signalintensitäten lieferten. Im zweiten Scanprozess wurde der Biochip unter Verwendung der neuen PMT-Einstellungen mit einer Auflösung von 10 µm gescannt. Die Laserstärke wurde mit 75% konstant gehalten.

### 2.13.6 Datenanalyse und Datenauswertung

Die gescannten Rohdaten wurden mit dem Programm ScanArray<sup>®</sup>Express Software, Version 2.1 und dem Programmunterpunkt EasyQuant analysiert. Nach Öffnen der Bilddateien und des gal.Files wurde das abgespeicherte Raster den aktuellen Spots auf dem Biochip durch den Befehl „Adjust Template and Register Images“ angepasst. Abweichende Subarrayraster wurden manuell nachjustiert. Durch den Befehl „Quantitate“ wurden die einzelnen Spots den jeweiligen Oligonukleotiden, und dadurch den jeweiligen Genen, zugeordnet. Bei dem gal.file handelt es sich um eine Datei, die die Zuordnung von Spot und Oligonukleotid bzw. Gen erlaubt. Alle Spots wurden manuell überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. Von diesen Daten wurde ein csv.File erstellt, der mit der Excel-Software weiter bearbeitet wurde. Der csv.File beinhaltete alle gefundenen Spots, die dazugehörigen Gene, und deren gemessene Intensitäten.

In der Datenauswertung wurden zuerst alle Pufferkontrollen und Arabidopsis-Kontrolloligonukleotide überprüft und anschließend herausgefiltert. Durch das Quantifizierungsprogramm wurden die Spots einer Qualitätskontrolle unterzogen. Spots, die nicht gefunden wurden, abwesend bzw. von schlechter Qualität waren, wurden herausgefiltert. Anschließend wurden die Werte des Cy3 bzw. Cy5-Kanals nach der Global-Loess Methode normalisiert und das Verhältnis gebildet. Die Normalisierung und die anschließende Bildung des Verhältnisses von Cy3 zu Cy5 bzw. umgekehrt, erfolgte durch ein Programm, das vom Nano+Bio Center, Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt wurde. Die Daten wurden in das Programm „Global normalization of microarray data with loess“ eingespeist. Analog wurde die Normalisierung mit den DyeSwap-Daten durchgeführt. Die errechneten Daten wurden übernommen und jedem Gen wurden die Werte beider DyeSwaps durch das Programm „Werte nebeneinander schreiben“, das ebenfalls vom Nano+Bio Center Kaiserslautern zur Verfügung gestellt wurde, zugewiesen. Da jedes Experiment mindestens zweimal durchgeführt worden ist, wurden alle normalisierten ratios eines Genes in einer Tabelle zusammengefasst. Diese Daten wurden wiederum in das Programm „T-test on logarithms of intensity-ratios of microarray data“ (Nano+Bio Center, Kaiserslautern) eingespeist, das unter anderem den P-Wert und das Durchschnittsverhältnis aller produzierten Daten errechnete. Es wurden nur die Gene weiter analysiert, die einen P-Wert von  $\leq 0,0001$  aufwiesen. Anschließend wurden die Gene herausgefiltert, die ein Verhältnis von  $\leq 0,5$  bzw.  $\geq 2,0$  aufwiesen. Diese wurden durch Internetrecherche bioinformatisch aufgearbeitet und charakterisiert.

#### **2.14 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der Amplifikate in Echtzeit. Am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte ansteigt (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993; Wittwer *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR angewandt, um die in mikroarraybasierten Transkriptomstudien (siehe 2.13) auffälligen Expressionssignale zu verifizieren. Mit Hilfe dieser Methode wurden spezifisch einzelne RNA-Fragmente nachgewiesen und quantitativ mit Referenzfragmenten verglichen. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass ein etwa 150 bp großes Produkt am 5'-Ende eines Gens amplifiziert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Produkt des 'housekeeping' Gens GyraseA mit den Oligonukleotiden RtgyrAf und RtgyrAr amplifiziert, in der Negativkontrolle wurde DEPC-H<sub>2</sub>O als Template eingesetzt (Halfmann *et al.*, 2007b).



Nach Präparation der Gesamt-RNA (siehe 2.6.7) erfolgte eine cDNA-Erststrangsynthese durch die reverse Transkriptase (siehe 2.7.7). Nachdem dieser Ansatz 1:100 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt worden war, wurden davon 5 µl direkt in eine LightCycler<sup>®</sup> Kapillare pipettiert.

In einem Mastermix wurden die Primer mit dem SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Takara Bio Inc., Otsu, Japan), in dem Puffer, SYBR<sup>®</sup>-Green und Enzym bereits vereint waren, gemischt und in die entsprechenden Kapillaren transferiert. Ein Reaktionsansatz setzte sich dabei folgendermaßen zusammen (Tab. 2. 40):

**Tab. 2. 40: Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes**

Komponente	Volumen [µl]
Template cDNA (1:100)	5
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>	10
sense-Primer (10 pmol/µl)	0,4
antisense-Primer (10 pmol/µl)	0,4
DEPC-H <sub>2</sub> O	4,2

Die Proben in den LightCycler<sup>®</sup> Kapillaren wurden für 15 sec bei 735 x g im LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche, Mannheim) zentrifugiert und danach in den LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Thermocycler (Roche, Mannheim) transferiert. Folgendes Programm wurde für die qRT-PCR verwendet (Tab. 2. 41):

**Tab. 2. 41: qRT-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	95	20
Denturierung	95	5
Amplifikation	60	20
Schmelzkurvenanalyse <sup>1</sup>	65-95	15
Kühlung	45	30

<sup>1</sup>: Ausgehend von 65 °C wurde die Temperatur mit 0,1 °C/sec auf 95 °C erhöht.

Nach jedem Zyklus wurde die SYBR<sup>®</sup> Green Fluoreszenz gemessen. Sobald das gemessene Fluoreszenzsignal höher war als das gemessene Hintergrundrauschen der Fluoreszenz, wurde ein sogenannter Crossing-Point-Wert gemessen. Diese Zahl gibt die Zykluszahl an, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Der Crossing-Point-Wert, der automatisch von der LightCycler Software 4.0 berechnet wurde, war umso niedriger, je mehr PCR-Produkt amplifiziert wurde. Das heißt je mehr cDNA als Template zur Verfügung stand, desto mehr Transkript war vorhanden gewesen. Als Normalisierungswert diente der gemessene Crossing-Point-Wert des GyraseA-PCR-Produktes. Dadurch wurde gewährleistet, dass Crossing-Point Unterschiede nicht durch unterschiedliche Gesamt-RNA-Konzentrationen

verfälscht wurden, sondern nur durch verschiedene Transkriptkonzentrationen zustande kamen.

In einem Experiment wurde jede Amplifikation zweimal durchgeführt, wobei der Mittelwert zur Berechnung des Crossing-Point-Wertes herangezogen wurde. Die Berechnung des Transkriptmengenunterschiedes von Transkripten zweier Stämme und die Einbeziehung normalisierter Werte erfolgte durch das Computerprogramm LightCycler Software 4.0 (Roche, Mannheim). Dabei wurde der Crossing-Point-Unterschied zur Basis von 2 logarithmiert, mit dem zugewiesenen Wert eines zu vergleichenden PCR-Produktes verglichen und der Expressionsunterschied berechnet.

Im Anschluss an den Amplifikationsschritt wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei die Temperatur sukzessive mit 0,1 °C/sec von 65 °C auf 95 °C erhöht wurde. Währenddessen wurde die SYBR<sup>®</sup> Green Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Die Schmelzkurvenanalyse diente zur Kontrolle, dass neben dem gewünschten PCR-Produkt keine weiteren Produkte amplifiziert worden waren.

## 2.15 Computergestützte Datenverarbeitung und –analyse

Folgende Computerprogramme und Datenbanken wurden zur Analyse von Genen und zur Aufbereitung von Daten zur Hilfe genommen:

### Computerprogramme:

**Artemis:** Feststellung der Lokalisation der verwendeten Oligonukleotiden im *S. pneumoniae* Genom während der microarraybasierten Transkriptomanalysen; allgemeine Lokalisation von Genen im Genom

**ChemWindow Version 5.0.1:** Darstellung chemischer Strukturformeln

**Chromas Version 1.62:** Visualisierung von DNA-Sequenzen

**Clone Manager Suite 7:** Erstellung von Restriktions- und Plasmidkarten; Lokalisierung und Design von Primern; in silico Klonierung

ScanArray<sup>®</sup>Express Software Version 2.1: Mikroarray-Datenanalyse

**Microcal<sup>™</sup> Origin<sup>™</sup> Version 7.0:** Graphische Darstellung von Wachstumskurven

### Internetseiten:

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov): Literaturrecherche

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>: Durchführung von BLASTs

---

<a href="http://smart.embl-heidelberg.de:">http://smart.embl-heidelberg.de:</a>	Genfunktionsanalyse
<a href="http://www.tigr.org:">http://www.tigr.org:</a>	Genomsequenzen
<a href="http://www.membranetransport.org:">http://www.membranetransport.org:</a>	Analyse von Transportern
<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/:</a>	Darstellung von Transmembranblots
<a href="http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/">http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/</a>	RNA-Faltung
<a href="http://www.tcdb.org:">http://www.tcdb.org:</a>	Datenbank: Klassifizierung von Transportern
<a href="http://saier-144-37.ucsd.edu/tms_align.html:">http://saier-144-37.ucsd.edu/tms_align.html:</a>	Analyse von Transmembranproteinen
<a href="http://align.genome.jp/">http://align.genome.jp/</a>	Multissequenzalignments

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vancoresmycinresistente Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae* R6 isoliert und phänotypisch charakterisiert. Zur Identifizierung genetischer Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin wurden Genbanken und mikroarraybasierte Transkriptomstudien durchgeführt. Potentielle genetische Resistenzmarker wurden anschließend detailliert analysiert, um abzuklären inwiefern sie in eine Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sind.

#### 3.1 Isolierung und phänotypische Charakterisierung vancoresmycinresistenter Labormutanten

Zu Beginn dieser Arbeit wurden vancoresmycinresistente Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 isoliert, um mögliche genetische Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin zu identifizieren. Diese Mutanten wurden zunächst hinsichtlich ihrer MHK-Werte für Vancoresmycin, ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Morphologie in Flüssigmedium charakterisiert. Ebenso wurde das Wachstumsverhalten nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin untersucht. Um einen Anhalt dafür zu gewinnen, wie effizient die jeweiligen Resistenzmarker übertragbar sind, wurde der vancoresmycinsensitive Rezipient R6 mit genomischer DNA der Mutanten transformiert.

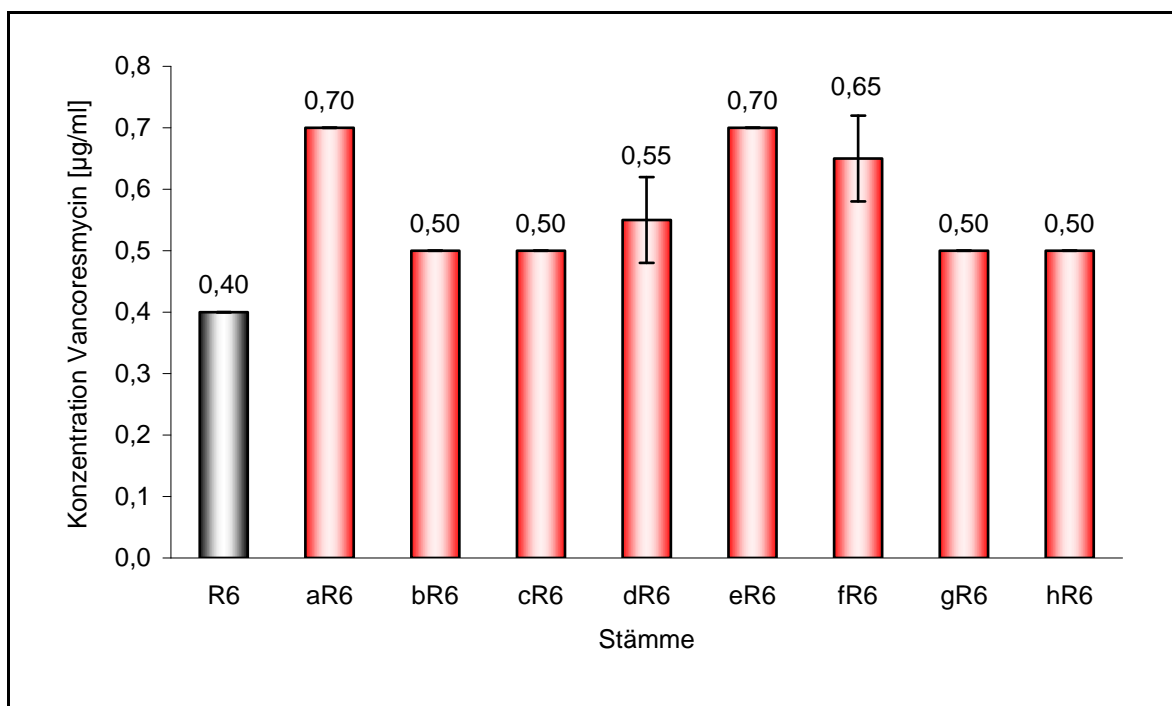
##### 3.1.1 Isolierung vancoresmycinresistenter Labormutanten

Zur Isolation vancoresmycinresistenter Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 wurde zunächst die MHK des Ausgangsstammes *S. pneumoniae* R6 für Vancoresmycin bestimmt. Die MHK betrug 0,4 µg/ml Vancoresmycin. An Hand dieser Konzentration wurde die Isolierung der Mutanten vorgenommen, indem eine Hauptkultur von *S. pneumoniae* R6 auf die Konzentrationen 0,4 µg/ml, 0,5 µg/ml und 0,6 µg/ml Vancoresmycin unverdünnt und verdünnt ausplattiert wurde. Der Zelltiter wurde auf Platten ohne Antibiotikum bestimmt und betrug  $1,05 \times 10^9$  Zellen/ml. Bei einer Konzentration von 0,4 µg/ml Vancoresmycin wuchsen  $5 \times 10^5$  Zellen/ml, was einem Wachstum von 0,05% entsprach. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Vancoresmycin wuchsen  $2 \times 10^2$  Zellen/ml, während bei einer Konzentration von 0,6 µg/ml Vancoresmycin das Wachstum vollständig inhibiert wurde. Insgesamt wurden acht Kolonien von Platten, die 0,5 µg/ml Vancoresmycin enthielten, abgeimpft, in Flüssigmedium angezogen und als Glycerindauerkultur konserviert. Die Mutanten wurden alphabetisch von aR6 bis hR6 bezeichnet. Durch Bestimmung der MHK der Mutanten für Vancoresmycin wurde bestätigt, dass es sich bei den abgeimpften Kolonien um Mutanten mit erhöhter Resistenz gegen Vancoresmycin handelte (siehe 3.1.2).

### 3.1.2 Bestimmung der MHK der Mutanten für Vancoresmycin

Nach Isolation der Mutanten bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Vancoresmycin, wurde untersucht, ob die acht Mutanten ein höheres Resistenzniveau hatten als der Referenzstamm R6. Die MHK-Bestimmung wurde in drei unabhängigen Experimenten mit steigenden Konzentrationen Vancoresmycin (zwischen 0,3 µg/ml und 0,7 µg/ml Vancoresmycin) durchgeführt. Daraus wurde der Mittelwert berechnet, der mit der MHK des Referenzstammes R6 verglichen wurde.

Alle Mutanten zeichneten sich durch einen erhöhten MHK-Wert im Vergleich zum Referenzstamm R6 aus, der eine MHK von 0,4 µg/ml Vancoresmycin aufwies (Abb. 3. 1). Die MHK der Mutanten aR6 und eR6 betrug 0,7 µg/ml Vancoresmycin und die der Mutante fR6 0,65 µg/ml, während die MHK der Mutanten bR6, cR6, gR6 und hR6 bei 0,5 µg/ml bzw. 0,55 µg/ml (dR6) Vancoresmycin lag. Die unterschiedlichen MHK-Werte deuteten bereits darauf hin, dass verschiedene Mutationsereignisse in den einzelnen Mutanten eingetreten waren.

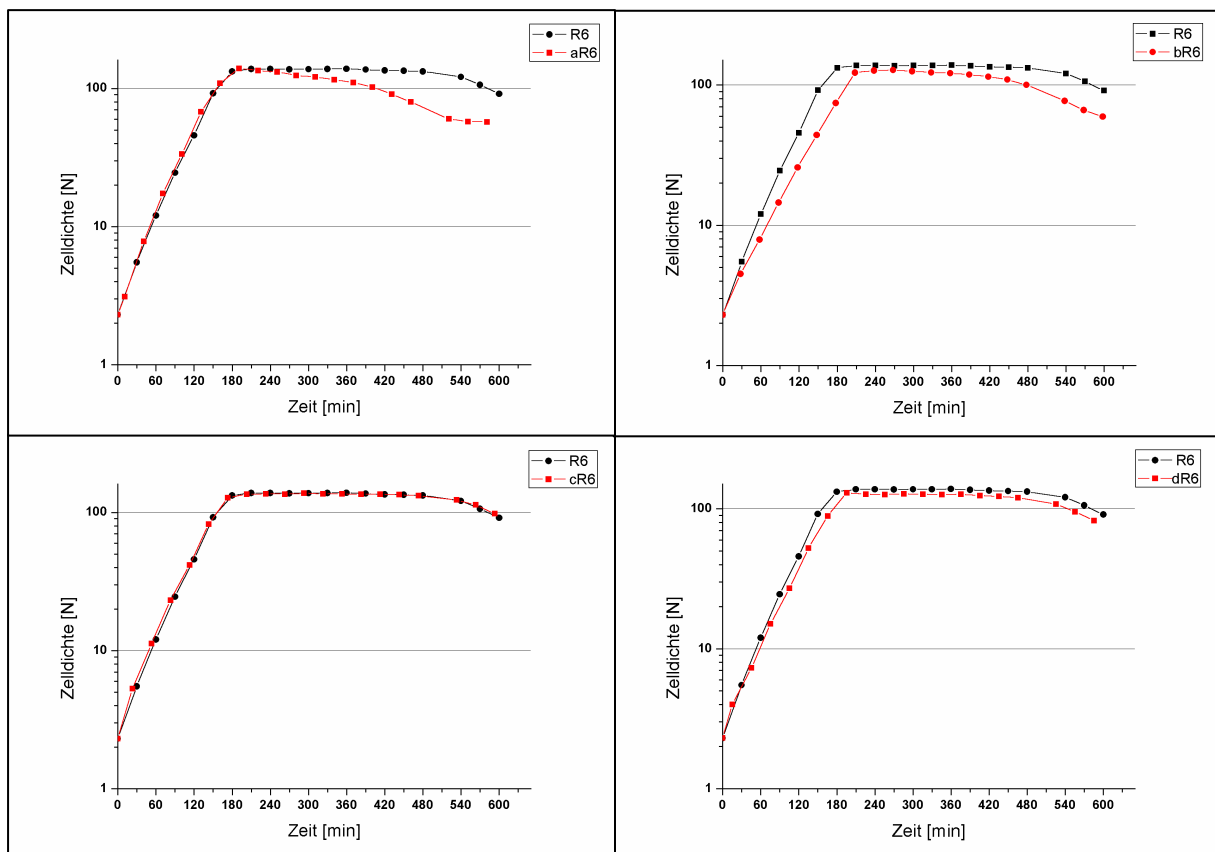


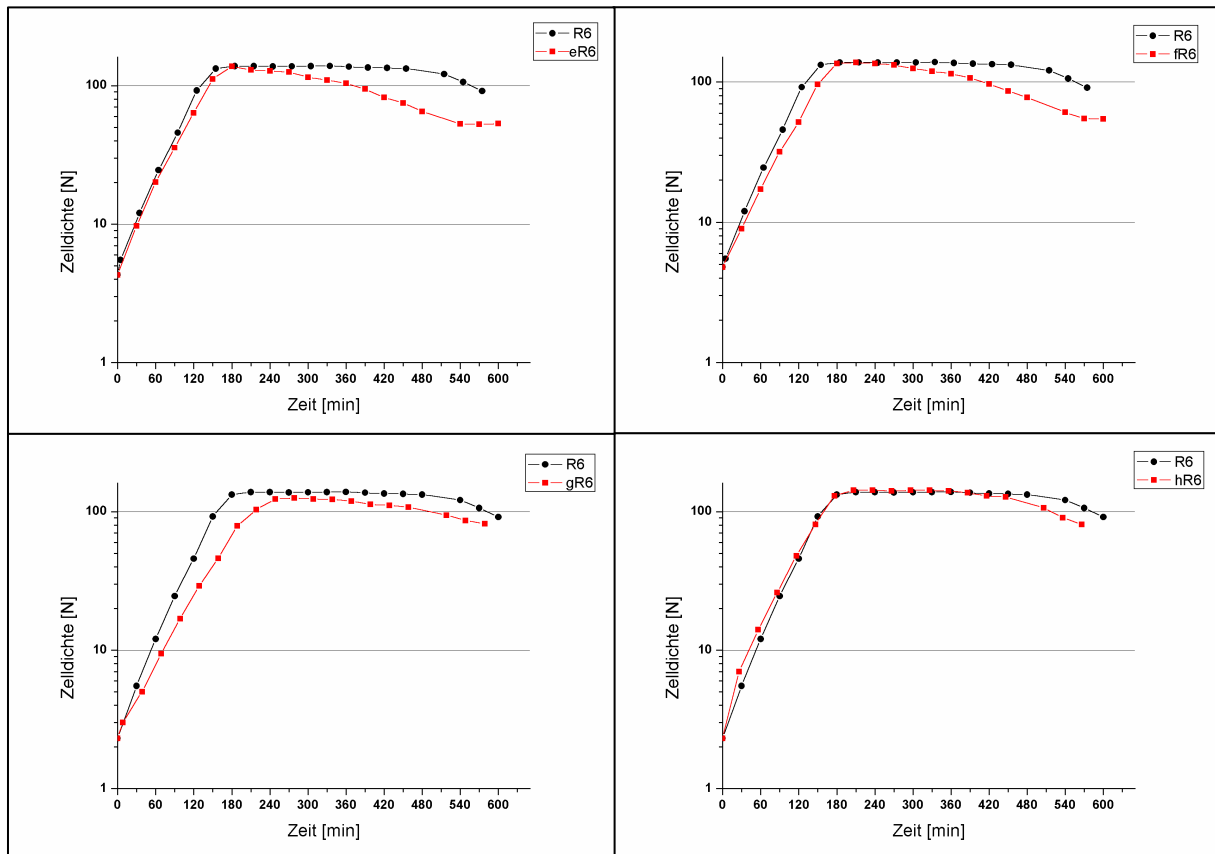
**Abb. 3. 1: Bestimmung der MHK der Mutanten für Vancoresmycin**

Die Bestimmung der MHK erfolgte auf D-Blutagarplatten mit steigenden Konzentrationen Vancoresmycin. Dargestellt sind die MHK-Werte, die dem Mittelwert dreier unabhängig durchgeführter MHK-Bestimmungen entsprechen. Die Standardabweichung ist angegeben (Referenzstamm R6: schwarz, Mutanten: rot).

### 3.1.3 Wachstumsverhalten der Mutanten und Morphologie in Flüssigkultur

Die Mutanten sollten anschließend durch ihr Wachstumsverhalten und ihrer Morphologie in Flüssigkultur charakterisiert werden. Das Wachstum der Mutanten wurde in C-Medium im Vergleich zum Referenzstamm R6 analysiert (Abb. 3. 2). Die Generationszeiten der einzelnen Mutanten betragen zwischen 31 min und 37 min (Tab. 3. 1). Zwar unterschieden sich die Generationszeiten der Mutanten von der des Referenzstammes R6 (31 min), aber die Unterschiede waren nur geringfügig. Die Mutanten bR6 und gR6 wiesen mit jeweils 37 min eine etwas längere Generationszeit im Vergleich zum Referenzstamm R6 auf. Neben der Generationszeit wurde auch die Dauer der Stationärphase mit einsetzender Autolyse beobachtet. Nach ca. fünf Stunden in der stationären Phase setzte im Referenzstamm R6 eine Autolyse ein. Die Mutanten cR6 und dR6 zeigten das gleiche Verhalten wie der Referenzstamm R6. Dagegen konnte bei den Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 eine verkürzte stationäre Phase von ca. 3 h, bei den Mutanten bR6 und hR6 von ca. 4 h festgestellt werden.





**Abb. 3. 2: Wachstumsverhalten der Mutanten in Flüssigmedium**

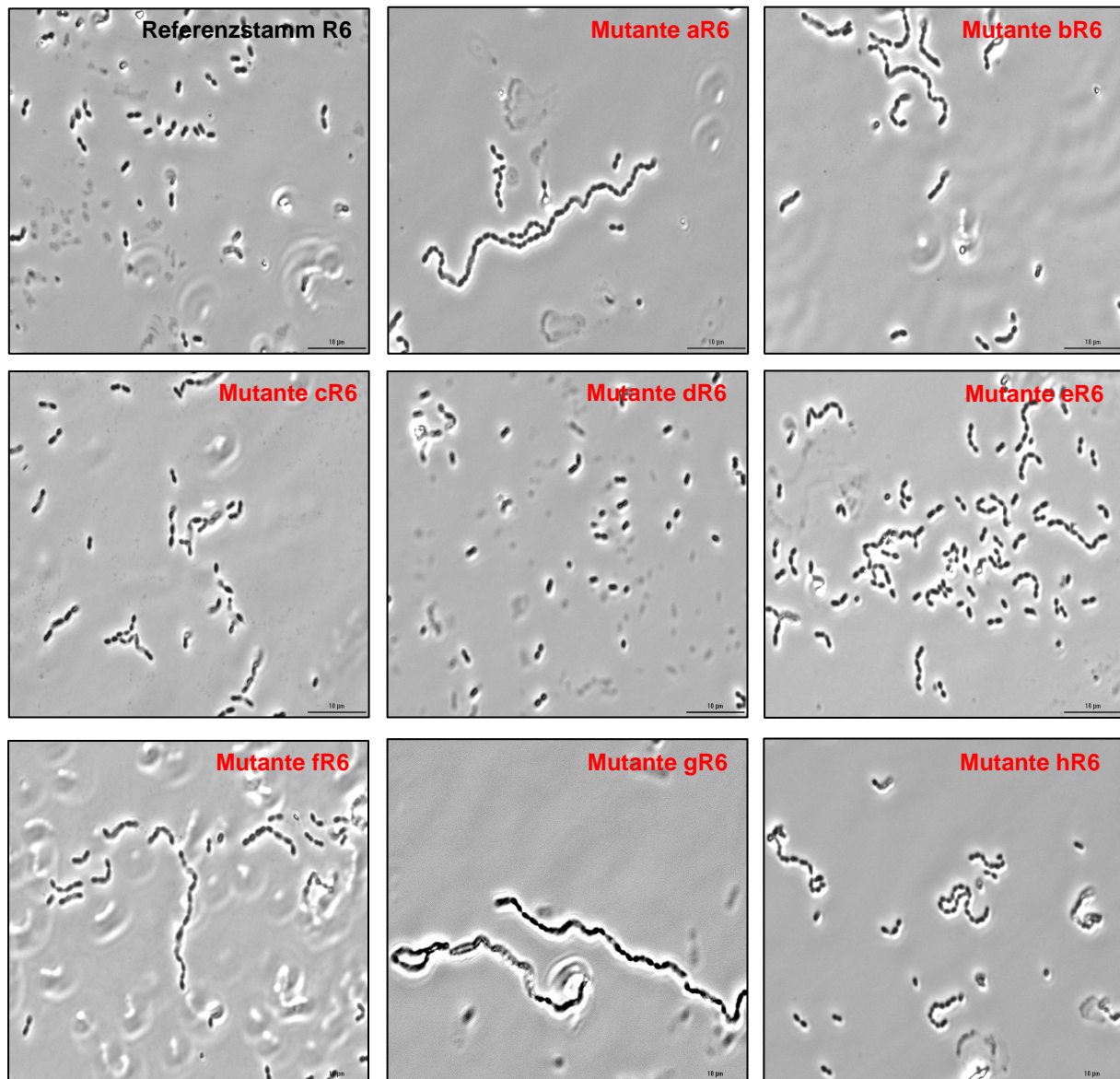
Dargestellt ist das Wachstum der Mutanten aR6 bis hR6 (rot) im Vergleich zum Referenzstamm R6 (schwarz) in C-Medium (halblogarithmische Darstellung).

**Tab. 3. 1: Wachstumsraten und Generationszeiten der Mutanten**

In dieser Tabelle werden die Wachstumsraten [1/min] und die Generationszeiten [min] des Referenzstammes R6 (schwarz) und der Mutanten (rot) aufgeführt.

Stamm	Wachstumsrate $\mu$ [1/min]	Generationszeit $g$ [min]
R6	0,022	31
aR6	0,023	31
bR6	0,019	37
cR6	0,022	32
dR6	0,021	33
eR6	0,022	32
fR6	0,021	33
gR6	0,019	37
hR6	0,021	34

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Morphologie der Mutanten in C-Medium untersucht (Abb. 3. 3). Die Mikroskopbilder wurden in der exponentiellen Wachstumsphase zwischen Nephelo 40 und Nephelo 60 angefertigt. Die Zellen des Referenzstammes R6 lagen überwiegend als Diplokokken vor, ebenso die Zellen der Mutante dR6. Die Mutanten bR6, cR6, eR6 und hR6 wuchsen in kurzen Ketten. Besonders die Mutanten aR6, fR6 und gR6 zeichneten sich durch ein verlängertes Kettenwachstum aus.



**Abb. 3. 3: Morphologische Analyse der Mutanten in Flüssigkultur**

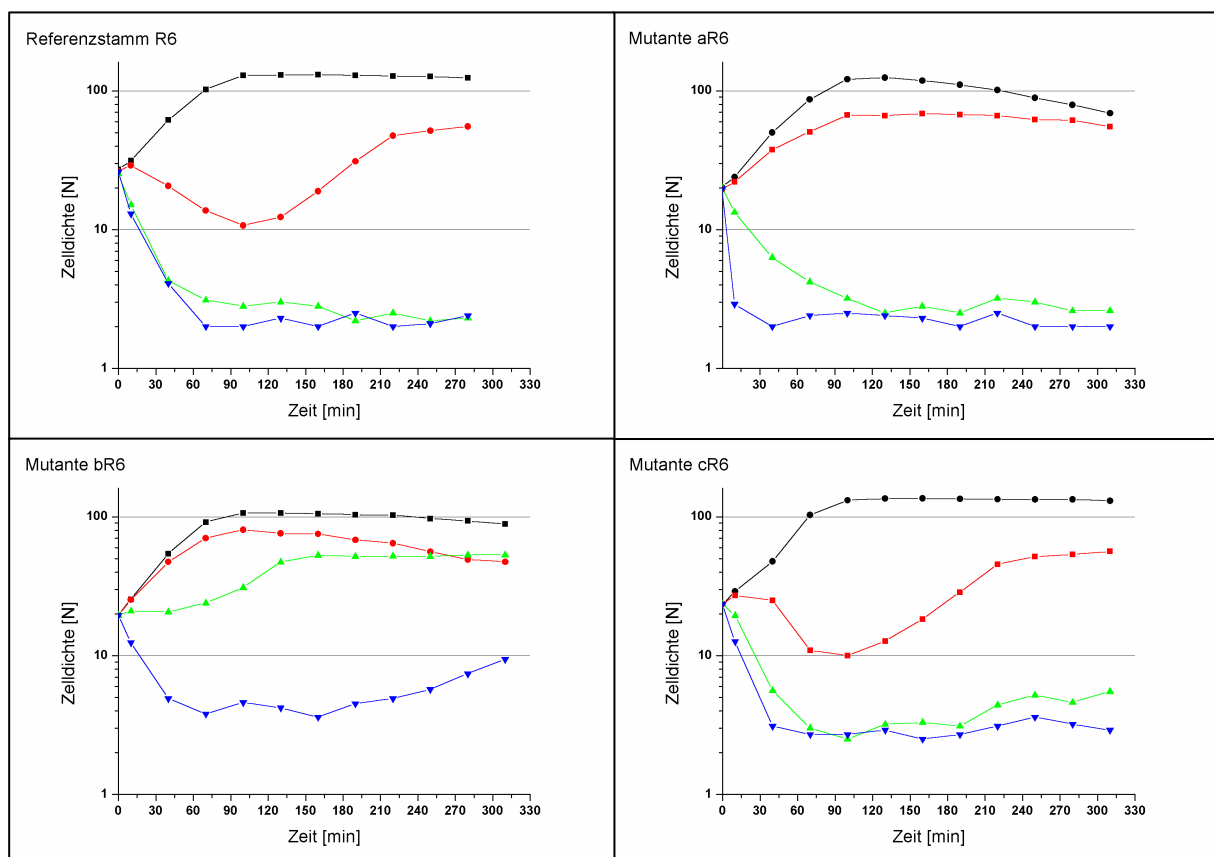
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden zwischen Nephelo 40 und 60 angefertigt. Als Referenz diente der Stamm R6 (schwarz beschriftet). Die Bilder der Mutanten aR6 bis hR6 sind rot beschriftet.

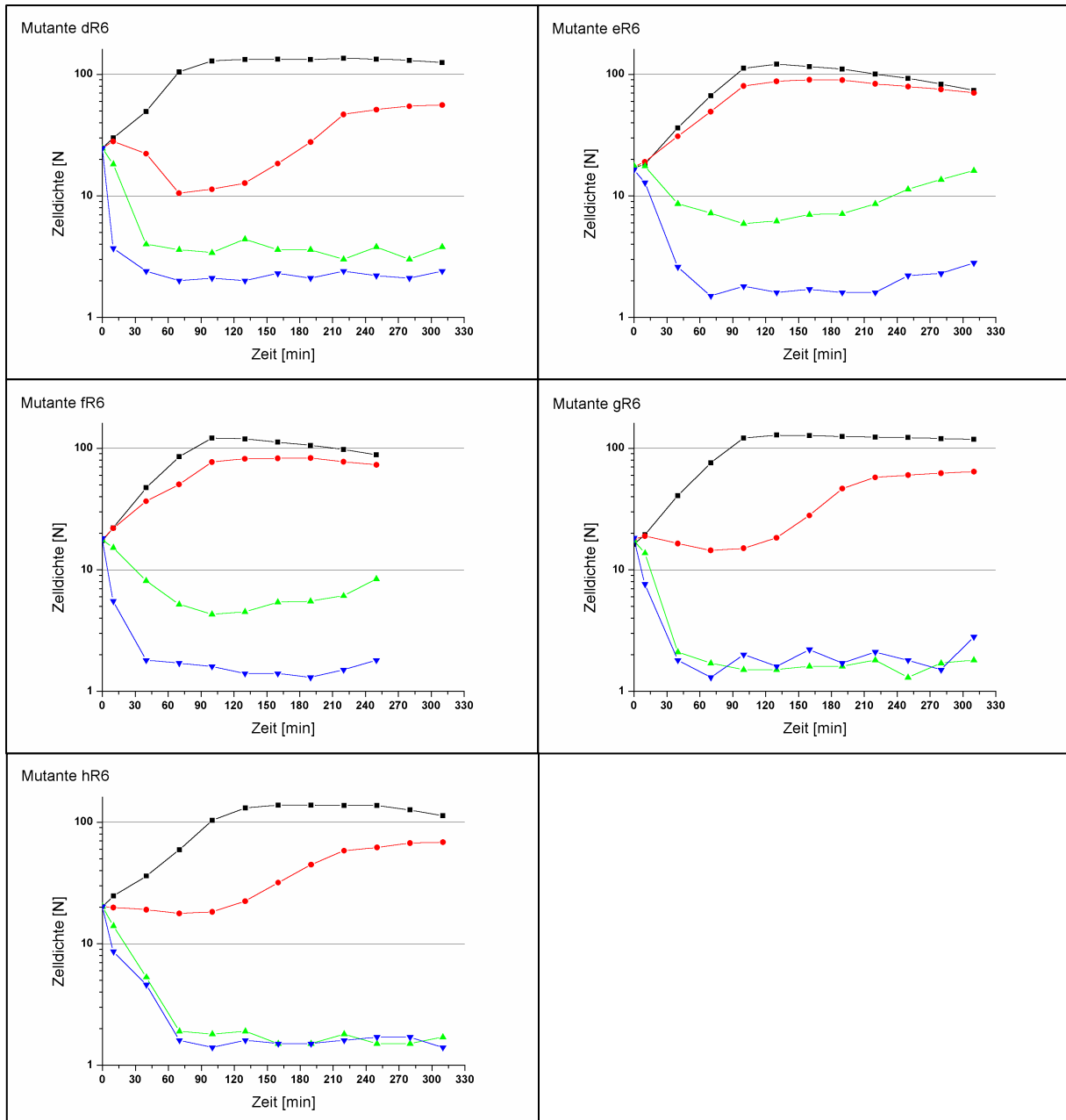


### 3.1.4 Wachstumsverhalten der Mutanten nach Zugabe von Vancoresmycin

Durch Zugabe eines Antibiotikums in eine wachsende Bakterienkultur können Rückschlüsse auf die Wirkung eines Antibiotikums gezogen werden, so dass ein Antibiotikum als bakteriolytisch, bakteriostatisch oder bakteriozid eingestuft werden kann. Um einzuschätzen, ob es sich bei Vancoresmycin um eine bakteriolytisches oder um ein bakteriostatisches Antibiotikum handelt, wurde das Wachstumsverhalten nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin analysiert. In diesem Zusammenhang wurde außerdem auf mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Mutanten nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin im Vergleich zum Referenzstamm R6 geachtet.

In diesem Versuch wurden Vorkulturen der Mutanten und des Referenzstammes R6 1:20 in 60 ml C-Medium verdünnt und bis zu einem Nephelowert von ca.  $N = 20$  inkubiert. Danach wurde die Kultur geteilt, und Vancoresmycin in Konzentrationen von  $0,25 \mu\text{g/ml}$ ,  $0,50 \mu\text{g/ml}$  und  $1,0 \mu\text{g/ml}$  dazu gegeben. Als Kontrolle diente die entsprechende Kultur ohne Antibiotikum. Nach zehn Minuten wurde die erste Messung der Zelldichte durchgeführt (Abb. 3. 4).





**Abb. 3. 4: Wachstumsverhalten der Mutanten nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin**

Jede Mutante wurde in 60 ml C-Medium bis Nephelo 20 inkubiert. Danach wurde die Kultur aliquotiert, und Vancoresmycin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Zur Kontrolle diente eine Kultur ohne Vancoresmycin (schwarz: ohne Vancoresmycin; rot: 0,25 µg/ml; grün 0,50 µg/ml; blau: 1,0 µg/ml). Der Zeitpunkt 0 gibt die Zugabe von Vancoresmycin an (halblogarithmische Darstellung).

Nach Zugabe von 0,25 µg/ml Vancoresmycin wurde für den Referenzstamm R6 und für die Mutanten cR6, dR6, gR6 und hR6 zunächst eine Abnahme der Zelldichte auf etwa  $N = 10$  festgestellt. Nach zwei bis drei Stunden nahmen die jeweiligen Zelldichten wieder bis zu einem Nephelowert von ca.  $N = 60-80$  zu. Das Wachstum der Mutanten aR6, bR6, eR6 und fR6 wurde nach Zugabe von 0,25 µg/ml Vancoresmycin im Vergleich zu den

entsprechenden Kontrollkulturen beeinträchtigt. Direkt nach der Antibiotikazugabe konnte keine Abnahme der Zelldichten beobachtet werden. Nachdem die Mutanten bis ca.  $N = 80$  weiter gewachsen waren, traten sie in die stationäre Phase ein.

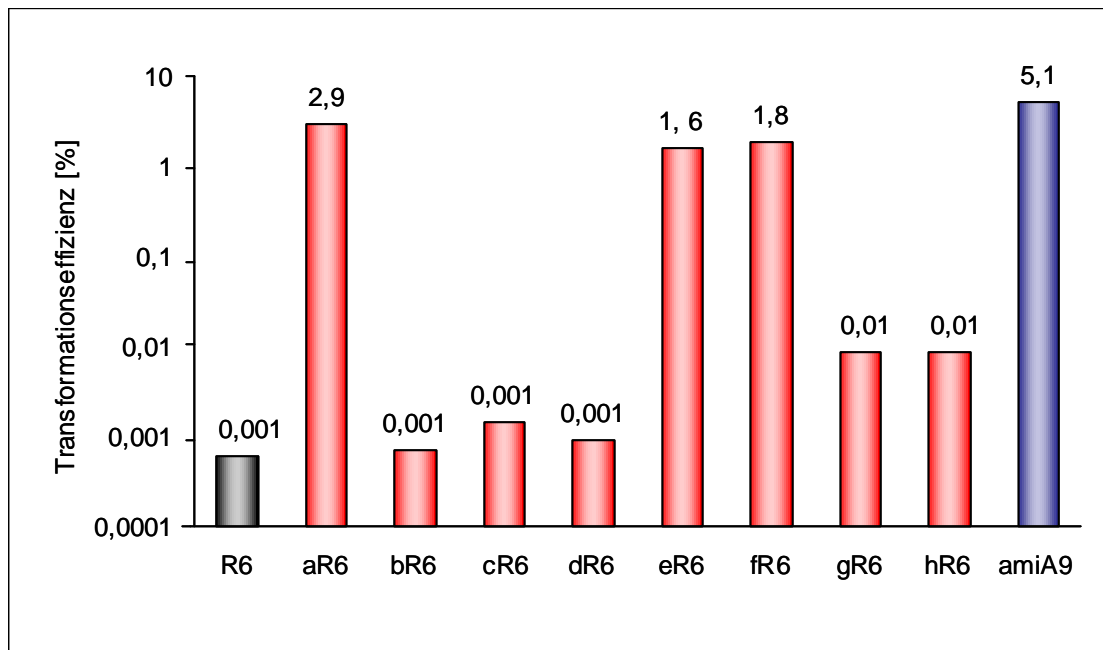
Nachdem eine Konzentration von  $0,50 \mu\text{g/ml}$  Vancoresmycin in die entsprechenden Kulturen zugegeben worden war, lysierten alle Kulturen außer die Kultur der Mutante bR6. Hier wurde keine Erniedrigung der Zelldichte festgestellt. Eine Zunahme der Zelldichte erfolgte allerdings in einem geringeren Umfang als die der Kontrollkultur ohne Vancoresmycin. Die stationäre Phase setzte bereits bei  $N = 50$  ein.

Nach Zugabe von  $1,0 \mu\text{g/ml}$  Vancoresmycin nahmen die Zelldichten aller untersuchten Stämme innerhalb kurzer Zeit bis auf Werte von  $N < 10$  ab, was vermuten lässt, dass Vancoresmycin eine Zelllyse ausgelöst hat.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde gezeigt, dass es sich bei Vancoresmycin um ein bakteriolytisches Antibiotikum handelt und dass die Mutanten nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin ein unterschiedliches Wachstumsverhalten im Vergleich zueinander und zum Referenzstamm R6 aufweisen.

### **3.1.5 Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit genomischer DNA der Mutanten und Selektion auf Vancoresmycin**

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden in welchem Maß die genetischen Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin der einzelnen Mutanten durch Transformation des sensitiven Rezipienten R6 übertragen werden können. Dazu wurden  $400 \text{ ng}$  genomische DNA der entsprechenden Mutanten in den sensitiven Rezipienten R6 transformiert und auf  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Vancoresmycin selektioniert (Abb. 3. 5). Als Negativkontrolle fungierte genomische DNA des Stammes R6. Als Positivkontrolle diente genomische DNA des Stammes *amiA9*, die aufgrund einer Punktmutation im *rpsL*-Gen eine Streptomycinresistenz aufweist (Salles *et al*, 1992), und die deshalb als Marker zur Bestimmung von Transformationseffizienzen eingesetzt wird. Der Resistenzmarker der Mutanten aR6, eR6 und fR6 wurde mit einer Effizienz von 2,9%, 1,6% bzw. 1,8% in den Rezipienten R6 transformiert. Der Resistenzmarker der anderen Mutanten ließ sich zwar transformieren, aber nur in einem geringen Umfang. Keine Donor-DNA konnte durch Transformation so effizient übertragen werden wie die der Positivkontrolle.



**Abb. 3. 5: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6 mit genomischer DNA der Mutanten**

Der sensitive Rezipient R6 wurde mit genomischer DNA der Mutanten (rot) bzw. des Referenzstammes R6 (Negativkontrolle, schwarz) und des Stammes amiA9 (Positivkontrolle, blau) transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin bzw. 200 µg/ml Streptomycin (amiA9) selektiert (halblogarithmische Darstellung).

### 3.2 Suche nach genetischen Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin mit Hilfe von Genbanken

Relevante Gene können durch die Erstellung von Genbanken und einem anschließenden Screeningverfahren detektiert werden. Diese Strategie sollte hier verfolgt werden, um genetische Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin zu identifizieren. Dabei sollte eine Genbank von einem resistenten Stamm angelegt werden, der deutlich gegen den Referenzstamm R6 selektionierbar ist. Aus diesem Grund wurde die Mutante aR6 für die Erstellung von Genbanken ausgewählt. Zum einen fiel diese Mutante durch einen relativ hohen MHK-Wert (0,7 µg/ml) im Vergleich zum Referenzstamm R6 (0,4 µg/ml) auf (siehe 3.1.2) und zum anderen zeichnete sie sich durch die höchste Effizienz aus, mit der die Vancoresmycinresistenz durch genetische Transformation in den Rezipienten R6 übertragen werden konnte (2,9%, siehe 3.1.5).

#### 3.2.1 Erstellung und Screening von Genbanken

Genbanken werden seit Jahren in vielen Variationen erstellt, so dass verschiedene Wirtssysteme und Vektoren zur Verfügung stehen. In den folgenden Experimenten diente *E. coli* als Wirtsorganismus, da die Erstellung von Genbanken in *E. coli* etabliert und die Anzucht, Handhabung und Lagerung des Bakteriums leicht möglich sind. Im Laufe dieser

Arbeit wurden verschiedene Vektoren verwendet, die in den folgenden Kapiteln erläutert werden (siehe 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

Das Screening verlief stets nach dem gleichen Prinzip: In den sensitiven Rezipienten *S. pneumoniae* R6 wurde ein Plasmid-DNA-Pool aus beispielsweise 24 Plasmiden (500 ng Plasmid-DNA) transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA der Mutante aR6 transformiert, als Negativkontrolle diente TE-Puffer. Sobald Transformanten erhalten wurden, wurden die Plasmide des entsprechenden Pools einzeln in den Rezipienten R6 transformiert und auf Vancoresmycin selektioniert. Konnte ein Plasmid als resistenzvermittelnd identifiziert werden, so wurden von diesem Plasmidinsert mehrere überlappende PCR-Produkte amplifiziert, die dann wiederum einzeln durch Transformation und Selektion getestet wurden. Das PCR-Produkt, das durch Transformation Vancoresmycinresistenz auf den sensitiven Rezipienten R6 übertrug, wurde anschließend sequenziert und mit der DNA-Sequenz von *S. pneumoniae* R6 verglichen (Genbanknummer: AE007317).

### 3.2.1.1 Genbank in dem high-copy-number Vektor pUH89

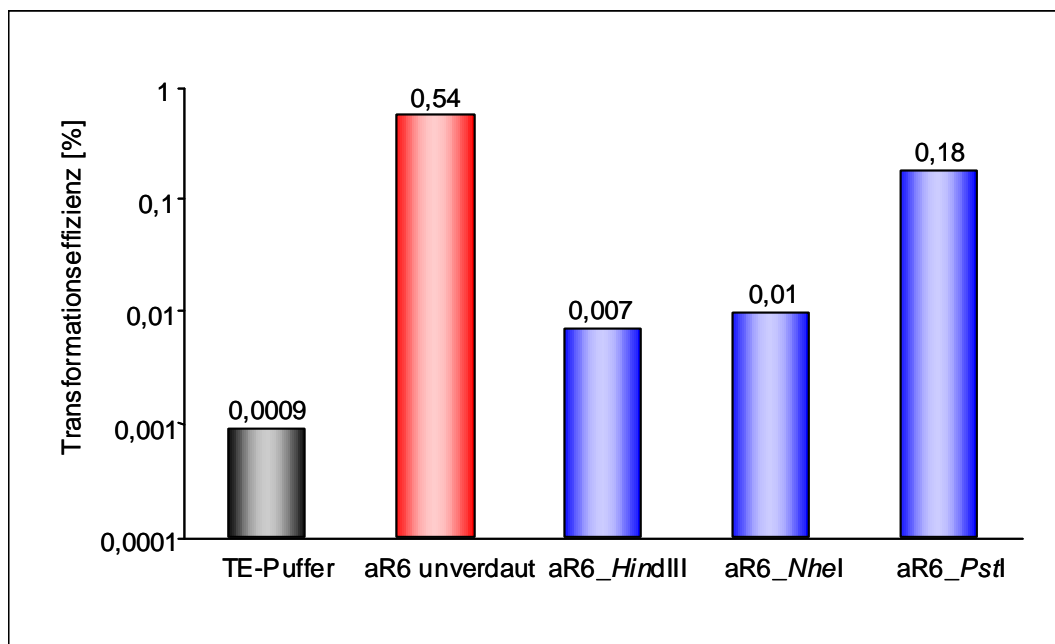
Zur Erstellung einer Genbank wurde der high-copy-number Vektor pUH89 eingesetzt (Henrich & Schmidtberger, 1995), der eine positive Selektion von rekombinanten *E. coli* Klonen durch Insertionsinaktivierung des modifizierten Lysegenes aus dem Bakterionphagen  $\phi$ X174 erlaubt. Das Lysegen *mE*, das unter der Kontrolle der nacheinander liegenden Promotoren  $P_{lac}$  und  $P_{tac}$  steht, wird konstitutiv in Stämmen exprimiert, die keinen lac-Repressor bilden. In diesem Lysegen befinden sich zehn Restriktionsstellen. Durch Ligation eines Inserts wird das Lysegen inaktiviert, wodurch die Transformanten nicht lysieren.

Um die Anzahl der benötigten rekombinanten *E. coli* Klone zu reduzieren, wurde eine angereicherte Genbank erstellt, d. h. es wurde nicht das gesamte Genom in den Vektor kloniert, sondern nur eine bestimmte Größenfraktion restringierter DNA, die zuvor auf Resistenzübertragung getestet worden war.

Zunächst wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die kompatibel zu den vorhandenen Schnittstellen des Vektors pUH89 waren und die das Genom von *S. pneumoniae* R6 etwa 400 bis 800 Mal schneiden, so dass die durchschnittliche Insertgröße zwischen 5,1 kb und 2,5 kb lag. Enzyme, die weniger als 400 Schnittstellen besaßen, wurden nicht weiter berücksichtigt, um die Insertgröße so klein wie möglich zu halten. Allerdings sollte die Insertgröße auch nicht zu klein sein, um zu vermeiden, dass die Sequenz des Resistenzmarkers durch Restriktion hydrolysiert werden würde. Als mögliche Enzyme

kamen *HindIII* mit 822 Schnittstellen, *PstI* mit 425 Schnittstellen und *NheI* mit 438 Schnittstellen in Frage.

In einem Vorversuch wurde der sensitive Rezipient R6 mit 400 ng *HindIII*-, *PstI*- bzw. *NheI*-restringierter DNA der Mutante aR6 transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektiert (Abb. 3. 6). Durch diesen Versuch sollte festgestellt werden, ob die Sequenz des Resistenzmarkers durch die Restriktion der entsprechenden Enzyme hydrolysiert und damit funktionslos geworden war. Als Positivkontrolle diente unverdaute genomische DNA der Mutante aR6 (400 ng), als Negativkontrolle TE-Puffer. Die Transformationseffizienz war bei Transformation der *PstI*-verdauten aR6-DNA mit 0,18% am höchsten neben der Positivkontrolle (0,54%). Die Transformationseffizienz betrug bei Transformation der *HindIII*-verdauten aR6-DNA 0,007% und bei Transformation der *NheI*-verdauten aR6-DNA 0,01%. Damit war die Transformationseffizienz bei Transformation der *PstI*-verdauten aR6-DNA um eine Zehnerpotenz höher als die der *HindIII*-verdauten aR6-DNA bzw. *NheI*-verdauten aR6-DNA. Aus diesem Grund wurde die Arbeit mit DNA, restringiert mit *PstI*, fortgesetzt.



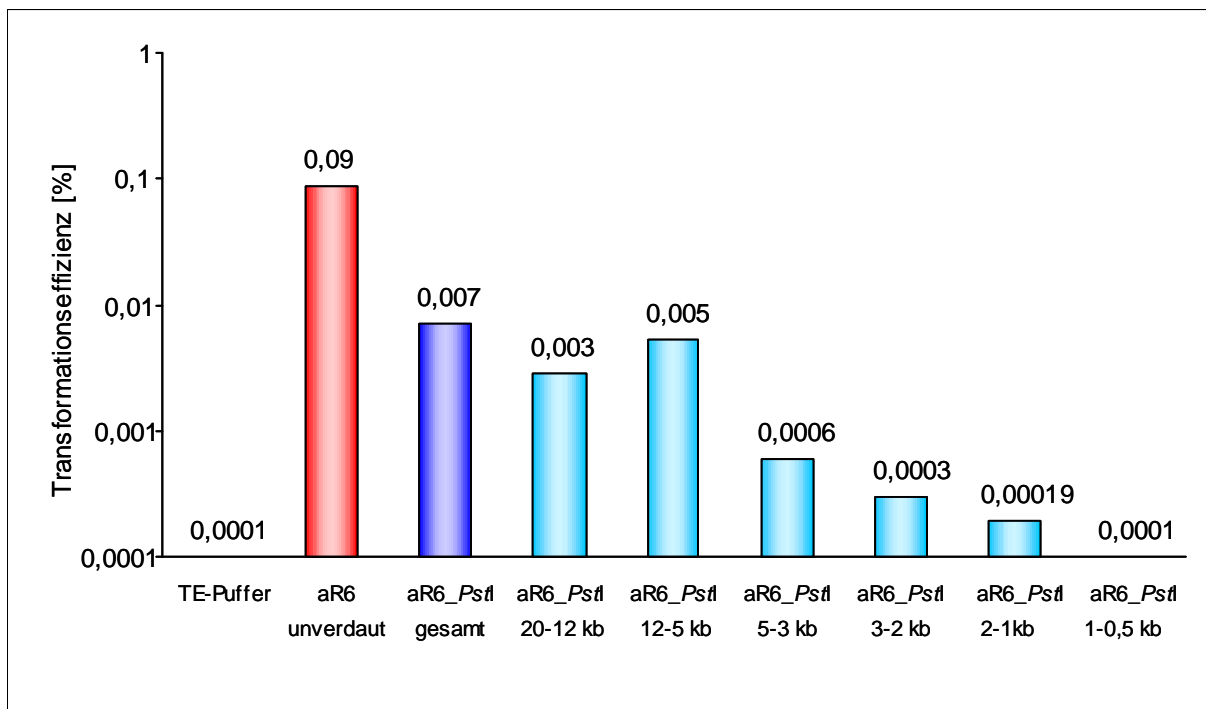
**Abb. 3. 6: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6 mit restringierter DNA der Mutante aR6**

Der Rezipient R6 wurde mit unverdauter DNA der Mutante aR6 (rot; Positivkontrolle), mit *HindIII*, mit *NheI* bzw. mit *PstI* restringierter DNA der Mutante aR6 (blau) transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektiert. Als Negativkontrolle diente TE-Puffer (schwarz).

Im nächsten Schritt wurden 50 µg genomische DNA der Mutante aR6 mit *PstI* restringiert und auf einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde ihrer

Größe nach in sechs Blöcken fraktioniert (Fraktionen: 20-12 kb, 12-5 kb, 5-3 kb, 3-2 kb, 2-1 kb und 1-0,5 kb) und aus dem Agarosegel eluiert.

In einer Transformation wurden 50 ng der einzelnen DNA-Fraktionen und 400 ng genomische DNA der Mutante aR6 bzw. 400 ng der *Pst*I-verdauten DNA eingesetzt. Durch Transformation des sensitiven Rezipienten R6 und Selektion auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin wurden die meisten Transformanten bei Transformation mit der Fraktion 12-5 kb erhalten (Abb. 3. 7). Die Transformationseffizienz betrug 0,005%. Die Transformationseffizienz, die durch Transformation der Fraktion 20-12 kb erhalten wurde, betrug 0,003%. Durch Transformation der Fraktion 5-3 kb, der Fraktion 3-2 kb, der Fraktion 2-1 kb und der Fraktion 1-0,5 kb konnten keine bzw. nur sehr wenige Transformanten erhalten werden, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Resistenzvermittelnde DNA-Sequenz auf einem Fragment größer 5 kb liegen musste. Die Transformationseffizienz bei Transformation mit genomischer DNA der Mutante aR6 betrug 0,09% und mit *Pst*I-verdauter DNA 0,007%. Die Fraktion 12-5 kb wurde deshalb für die Ligation mit dem *Pst*I verdauten Vektor pUH89 eingesetzt.



**Abb. 3. 7: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6 mit größenfraktionierter *Pst*I-restringierter DNA der Mutante aR6**

Der Rezipient R6 wurde mit unverdauter DNA der Mutante aR6 (Positivkontrolle, rot), mit *Pst*I verdauter DNA der Mutante aR6 (Positivkontrolle, blau) und mit Größenfraktionen der *Pst*I-verdauten DNA der Mutante aR6 (hellblau) transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Als Negativkontrolle diente TE-Puffer (halblogarithmische Darstellung).

*E. coli* ER1562 wurde mit dem Ligationsansatz durch Elektrottransformation transformiert und auf 200 µg/ml Ampicillin selektioniert. Nach 24 h wurden insgesamt 450 Transformanten

abgeimpft und auf LB-Platten (200 µg/ml Ampicillin) transferiert. Die einzelnen Transformanten wurden dabei auf zwei LB-Platten überimpft, so dass eine Platte als Masterplatte und die andere als sog. Abschwemmplatte dienen konnte. Pro Platte wurden 50 Kolonien ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden wurden die Kolonien der einzelnen Abschwemmplatten mit LB-Medium abgeschwemmt. Aus dem abgeschwemmten Zellmaterial wurden die rekombinanten Plasmide als Pool isoliert. Dabei betrug die durchschnittliche Insertgröße etwa 6 kb.

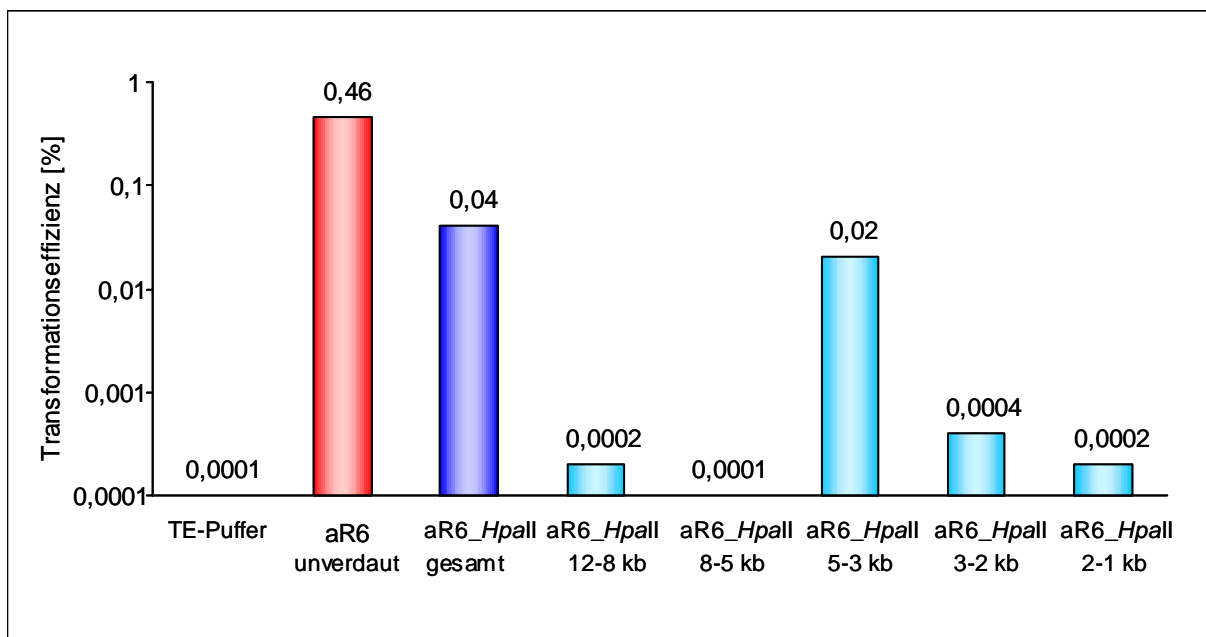
Der sensitive Rezipienten R6 wurde mit 500 ng DNA pro Plasmidpool transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Durch die transformierte DNA-Menge von 500 ng sollte gewährleistet sein, dass jedes Plasmid im Durchschnitt mit 10 ng Plasmid-DNA vertreten ist. Unter der Annahme es handele sich um einen 4 kb großen Resistenzmarker, der sich in einem der 50 Plasmide befindet, so liegt dieser in einem Plasmidpool etwa zu 0,9% vor (pro Pool: 460 kb DNA). Im Gegensatz dazu liegt der Resistenzmarker im vollständigen Genom (2039 kb) zu 0,2% vor. Bei Transformation von 500 ng Plasmid-DNA sollte der Resistenzmarker etwa viermal häufiger vorhanden sein als bei Transformation von 400 ng genomischer DNA der Mutante aR6. Deshalb sollte die Plasmid-DNA-Menge ausreichen die Resistenz zu detektieren. Zudem ist in dieser Rechnung nicht berücksichtigt worden, dass es sich um eine angereicherte Genbank handelt. Allerdings wurden keine Transformanten erhalten. Nach der gleichen Vorgehensweise, wie eben beschrieben, wurde eine zweite Genbank von der Mutante aR6 mit weiteren 500 Klonen erstellt und ohne Erfolg gescreent. Möglicherweise lag die resistenzvermittelnde DNA-Sequenz auf einem sehr großen DNA-Fragment, das nicht kloniert worden war oder die gesuchte DNA-Sequenz konnte in einen high-copy-number Vektor nicht kloniert werden (siehe 3.2.1.2).

### **3.2.1.2 Genbank in dem low-copy-number Vektor pWSK129**

In der Literatur wurde beschrieben, dass einige Gene, die für regulatorische Proteine oder Membranproteine codieren, nicht in einen high-copy-number Vektor, dafür aber in einen low-copy-number Vektor kloniert werden konnten (Wang & Kushner, 1989; Murray & Kelley, 1979; Hansen & von Meyenburg, 1979; Spratt *et al.*, 1980; Beck & Bremer, 1980; Claverie-Martin *et al.*, 1989). Da beim Screening der Genbank, die in dem high-copy-number Vektor pUH89 erstellt worden war, die gesuchte Resistenzdeterminante nicht identifiziert worden war (siehe 3.2.1.1), sollte eine weitere Genbank unter Verwendung des low-copy-number Vektors pWSK129 erstellt werden (Wang & Kushner, 1991). Dieser 6,7 kb große Vektor besitzt das Replikon pSC101, das eine Kopiezahl von sechs bis acht Kopien pro Zelle gewährleistet. Außerdem wurde nach neuen Restriktionsenzymen gesucht, die das Genom der Mutante aR6 etwa 800 Mal scheiden, um die Insertgröße der zu klonierenden DNA zu verringern. Besonderes Interesse fiel auf das Enzym *Hpa*II, das das Genom von *S.*



*pneumoniae* R6 819 Mal schneidet. In einem Vorversuch wurde sichergestellt, dass durch Transformation des Rezipienten R6 mit der *Hpa*II-restringierten DNA der Mutante aR6 Transformanten erhalten werden. Nach Restriktion von 50 µg genomischer DNA der Mutante aR6 mit *Hpa*II, wurde die restringierte DNA mit Hilfe eines präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ihrer Größe nach in fünf Fraktionen (12-8 kb, 8-5 kb, 5-3 kb, 3-2 kb und 2-1 kb) eluiert. Anschließend wurde der sensitive Rezipient *S. pneumoniae* R6 mit jeweils 100 ng DNA der einzelnen Größenfraktionen transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektiert.



**Abb. 3. 8: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6 mit größenfraktionierter *Hpa*II-restringierter DNA der Mutante aR6**

Der sensitive Rezipient wurde mit den einzelnen Fraktionen der mit *Hpa*II-restringierten DNA der Mutante aR6 transformiert (hellblau). Als Positivkontrolle diente unverdaute DNA der Mutante aR6 (rot) und mit *Hpa*II-restringierte DNA der Mutante aR6 (blau), als Negativkontrolle TE-Puffer (halblogarithmische Darstellung).

Wie in Abb. 3. 8 dargestellt ist, konnten durch Transformation der Fraktion 5-3 kb die meisten Transformanten erhalten werden, wobei die Transformationseffizienz 0,02% betrug. Durch Transformation mit DNA der anderen Größenfraktionen konnten lediglich Transformationseffizienzen von 0,0001% bis 0,0004% erreicht werden. Dieses Transformationsexperiment zeigte, dass das gesuchte Resistenzfragment in der Größenfraktion 5-3 kb vorliegen musste. Deshalb wurde diese Größenfraktion in den mit *AccI* verdauten und desphosphorylierten Vektor pWSK129 ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz durch Elektrottransformation transformiert und auf 25 µg/ml Kanamycin selektiert. Durch ein Blau-Weiß-Screening konnten rekombinante Klone von nicht

rekombinanten Klonen unterschieden werden. Insgesamt wurden 2016 weiße Kolonien in die mit 0,7 ml LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) befüllten Wells der Deep-well-Platten transferiert, die anschließend bei 37 °C inkubiert wurden. Nach 24 h wurden pro Klon jeweils 200 µl Kultur abgenommen und zu Pools von je 48 Kulturen vereinigt. Die Kulturreste wurden durch Zugabe von Glycerin und Einfrieren bei –80 °C konserviert. Die Plasmide der 42 Pools wurden isoliert, in den sensitiven Rezipienten R6 transformiert (pro Pool 500 ng Plasmid-DNA) und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Durch die transformierte DNA-Menge von 500 ng sollte gewährleistet sein, dass jedes Plasmid im Durchschnitt mit 10,4 ng Plasmid-DNA vertreten ist. Unter der Annahme es handele sich um einen 3 kb großen Resistenzmarker, der sich in einem der 48 Plasmide befindet, so liegt dieser in einem Plasmidpool etwa zu 0,64% vor (pro Pool: 466 kb DNA). Im Gegensatz dazu liegt der Resistenzmarker im vollständigen Genom (2039 kb) zu 0,2% vor. Bei Transformation von 500 ng Plasmid-DNA sollte der Resistenzmarker etwa dreimal häufiger vorhanden sein als bei Transformation von 400 ng genomischer DNA der Mutante aR6. Deshalb sollte die Plasmid-DNA-Menge ausreichen die Resistenz zu detektieren. Zudem ist in dieser Rechnung nicht berücksichtigt worden, dass es sich um eine angereicherte Genbank handelt. Allerdings konnten keine Transformanten identifiziert werden.

Parallel dazu wurde die durchschnittliche Insertgröße ermittelt. Diese betrug 3 kb. Das bedeutete, dass nur sehr wenige Inserts größer als 4 kb in der Genbank vorlagen. Da durch Transformation der Fraktion 5-3 kb die meisten Transformanten erhalten wurden, wäre es denkbar, dass die resistenzvermittelnde Determinante auf einem 5 kb großen DNA-Fragment lag, das nicht effizient genug kloniert worden war.

### 3.2.1.3 Fosmidgenbank unter Verwendung des Vektors pCC1FOS

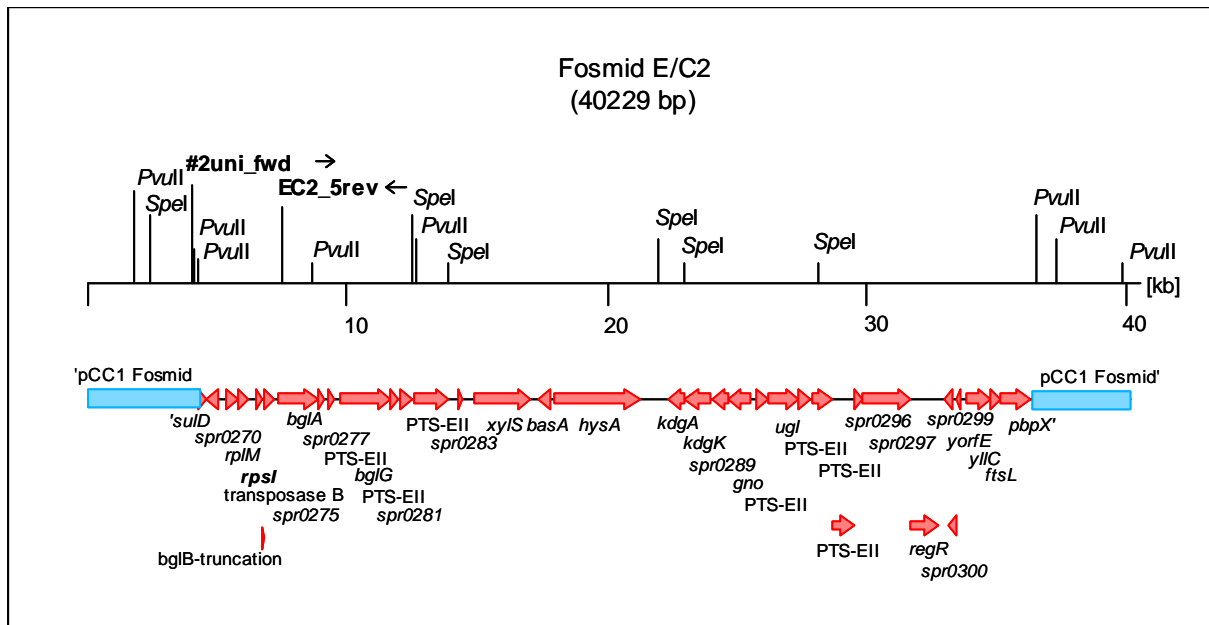
In den beiden vorangegangenen Experimenten war es nicht möglich, die Resistenzdeterminante der Mutante aR6 in angereicherten Genbanken (siehe 3.2.1.1, 3.2.1.2) zu klonieren. Aufgrund dessen wurde das gesamte Genom der Mutante aR6 in einer Fosmidgenbank angelegt. Dazu wurde das CopyControl™ Fosmid Library Production Kit von der Firma EPICENTRE (Madison, USA) verwendet. Dieses System beinhaltet den Vektor CopyControl™ pCC1™FOS, der einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu den bisher verwendeten Vektoren besitzt: dieser Vektor verfügt über zwei verschiedene Replikationsursprünge. Der Replikationsursprung *ori2* gewährleistet, dass das Fosmid in der Zelle als Einzelkopie vorliegt. Der zweite Replikationsursprung, *oriV*, ist ein induzierbarer Replikationsursprung, der die Kopienzahl in einer Zelle erhöht. Dabei benötigt *oriV* zur Initiierung der Replikation das Genprodukt, codiert durch das Gen *trfA*, dessen Expression durch einen induzierbaren Promotor im Wirtstamm *E. coli* EPI300™-T1<sup>R</sup> reguliert wird (Herstellerangaben, Wild *et al.*, 2002).

Parallel zur Erstellung der ersten Fosmidgenbank wurde eine Kontrolle durchgeführt, um die Vorgehensweise zur Erstellung einer Fosmidgenbank zu überprüfen. Dabei wurde das System durch Verpacken von Kontroll-DNA getestet, die im Kit enthalten war und eine Größe von 36 kb hatte. Die Verpackungseffizienz der Kontroll-DNA betrug  $2,9 \times 10^7$  CFU/ml und war damit fast drei Mal so hoch als die Herstellerangaben von  $1 \times 10^7$  CFU/ml (siehe 2.8). Die Verpackungseffizienz der DNA der Mutante aR6 lag bei  $2,2 \times 10^4$  CFU/ml, wobei gleiche DNA-Mengen ligiert und verpackt wurden. Die Ursache der erniedrigten Effizienz lag vermutlich an den unterschiedlich großen DNA-Fragmenten, die nicht immer genau eine Größe von 36 kb besaßen wie die der Kontroll-DNA.

Mit Hilfe der Formel  $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$  (Sambrook *et al.*, 1989) konnte die Anzahl der benötigten Fosmidklone berechnet werden, die notwendig waren um das Genom mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit abzudecken. Dabei gibt P die gewünschte Wahrscheinlichkeit an, mit der eine DNA-Sequenz in der Genbank vorkommen soll, f das Verhältnis der Größe eines Fosmidinserts zur Größe des gesamten Genoms an. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 99,99 %, und einem Verhältnis f von 0,01766 (36 kb / 2039 kb) wurde eine Anzahl von 517 benötigten Fosmidklonen berechnet. Um sicher zustellen, dass die Genbank das Genom mit einer ausreichenden Mengen an Klonen repräsentierte, wurden 672 Klone abgeimpft und in die mit 250 µl LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) befüllten Wells der Deep-Well-Platten transferiert. Die Klone wurden über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde pro Well 60 µl Glycerin zugegeben, gemischt und bei -80 °C konserviert.

Die Klone wurden einzeln angezogen, und die entsprechenden Fosmide einzeln isoliert. Anschließend wurden zwölf Fosmide zu einem DNA-Pool zusammengefasst, wobei jedes Fosmid mit etwa 40 ng in einem Pool vertreten war. Der sensitive Rezipient *S. pneumoniae* R6 wurde mit 500 ng Fosmid-DNA transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert.

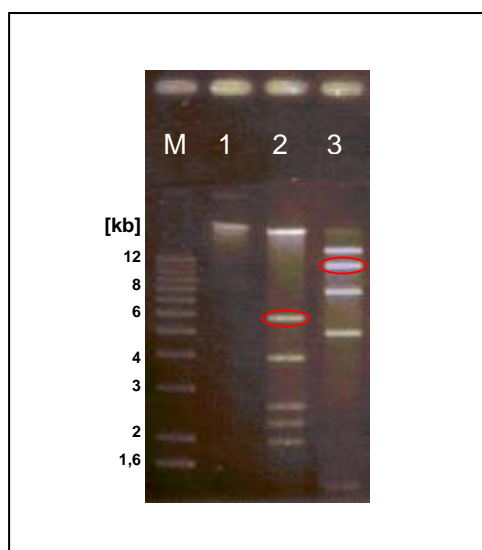
Während des Screeningverfahrens konnte ein Fosmid ermittelt werden, das Vancoresmycinresistenz übertrug. Die Transformationseffizienz dieses Fosmides (Fosmid E/C2) betrug 0,03%. Im Vergleich dazu betrug die Transformationseffizienz für genomische DNA der Mutante aR6 0,3%. Die entsprechende Genomsequenz im Genom von *S. pneumoniae* R6 wurde durch Ansequenzierung des Inserts mit den Primern #2uni\_fwd und #2uni\_rev ermittelt. Das Insert entsprach der *S. pneumoniae* R6 Sequenz (Genbanknummer: AE007317) von bp 271.359 bis bp 303.448 (Abb. 3.9).



**Abb. 3. 9: Genkarte Fosmid E/C2**

In dieser Abbildung ist die genetische Organisation der in Fosmid E/C2 klonierten Region aus *S. pneumoniae* R6 gezeigt. Markiert sind die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *SpeI* sowie die Lokalisation der Oligonukleotide #2uni\_fwd und E/C2\_5rev (fett). Das Gen *rpsI* ist fett hervorgehoben.

Dieses Fosmid wurde zunächst zur Bestätigung mit den Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *SpeI* verdaut (Abb. 3. 10). Dabei sollte die Bande für das mit *PvuII* verdauten Fosmid bei 23,9; 4,5; 4,0; 2,6; 2,3; 2,0; 0,7 und 0,054 kb und für das mit *SpeI* verdauten Fosmid bei 14,5; 10,0; 8,1; 5,1; 1,4 und 1 kb liegen. Aufgrund des erhaltenen Bandenmusters wurde aber festgestellt, dass die erwartete 4,5 kb Bande des *PvuII*-Verdaus und die erwartete 10 kb Bande des *SpeI*-Verdaus etwa 1,3 kb größer waren als die errechneten Banden.

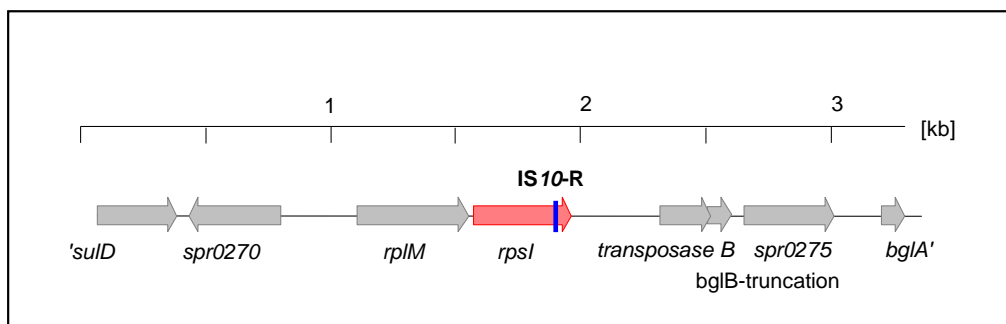


**Abb. 3. 10: Restriktionsverdau des Fosmides E/C2 mit *PvuII* und *SpeI***

In Spur 1 ist das unverdaute Fosmid E/C2 zu sehen, in Spur 2 das mit *PvuII* verdauten Fosmid E/C2 und in Spur 3 das mit *SpeI* verdauten Fosmid E/C2 zu sehen. Die Banden, die größer vorlagen als errechnet, sind rot markiert (M=Marker).

Die Fragmente deckten die ersten 4,6 kb des Fosmidinserts ab. Anschließend wurde ein PCR-Produkt mit den Primern #2uni\_fwd und E/C2\_5rev amplifiziert (Lage der Primer siehe Abb. 3.9), wobei das PCR-Produkt ebenfalls nicht die errechnete Größe von 3,3 kb aufwies, sondern etwa 4,5 kb. Der Rezipient R6 wurde mit 100 ng PCR-Produkt transformiert und auf 0,5 µg Vancoresmycin selektiert. Die Transformationseffizienz des sensitiven Rezipienten R6 mit dem PCR-Produkt lag bei 0,9%, im Vergleich zu der Transformationseffizienz mit der genomischen DNA der Mutante aR6, die bei 0,99% lag. Dadurch wurde bestätigt, dass das PCR-Produkt eine Vancoresmycinresistenz überträgt.

Das 4,5 kb große PCR-Produkt wurde vollständig doppelsträngig sequenziert. Nach bioinformatischer Analyse konnte aufgeklärt werden, dass das Gen *rpsI*, durch eine Insertionssequenz, das IS10-R, unterbrochen worden war (Abb. 3. 11).



**Abb. 3. 11: Genetische Organisation der Region um das Gen *rpsI***

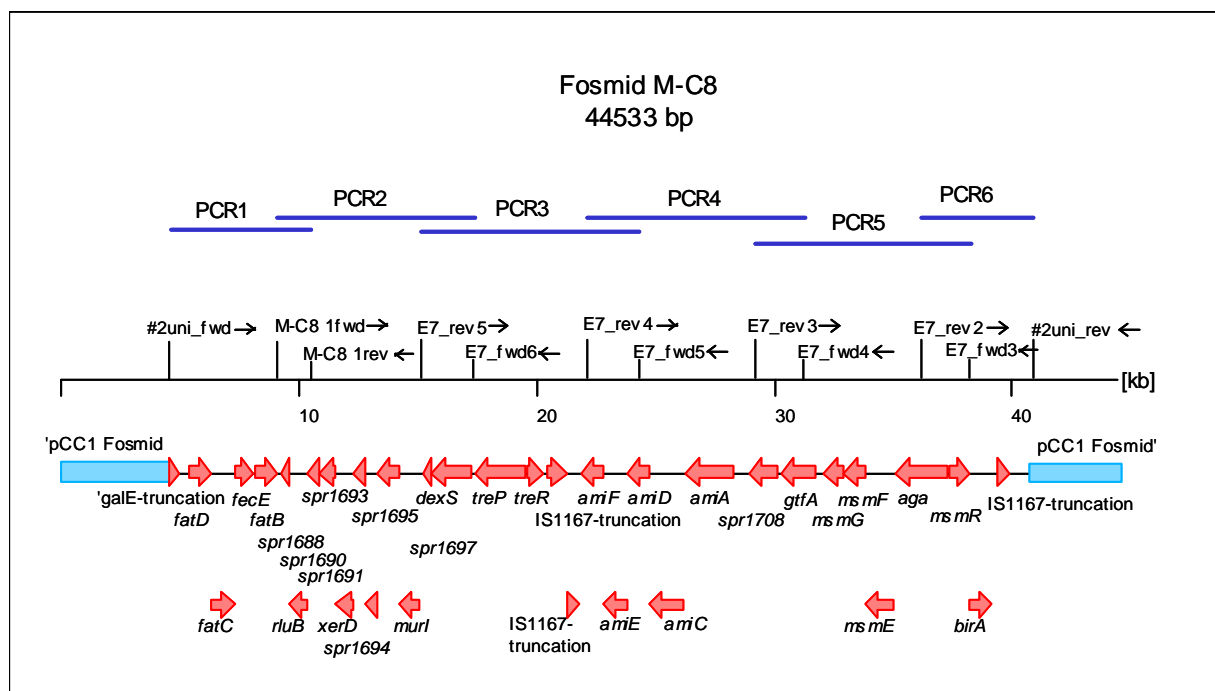
In dieser Abbildung ist schematisch die Insertionsstelle des IS10-R (blaue Markierung) in das Gen *rpsI* (rot) wiedergegeben.

Außerdem wurde durch eine Sequenzierung gezeigt, dass das Gen *rpsI* in der Mutante aR6 unverändert vorlag. Auf die Auswirkungen der IS10-R-Insertion in das Gen *rpsI* wird in Kapitel 3.2.2.1 detailliert eingegangen.

Im Anschluss daran wurde eine zweite Fosmidgenbank mit 1056 Klonen von der Mutante aR6 erstellt. Die Vorgehensweise unterschied sich von der Erstellung und Screening der ersten Genbank durch folgende Punkte (siehe 2.8): Erstens wurde der Ligationsansatz statt in 2 x 25 µl nur mit 25 µl 'MaxPlax Lambda Packaging Extracts' verpackt. Nach der Verpackungsreaktion wurden 500 µl Phagendilutionspuffer zugegeben. Zweitens wurden die Fosmide nicht mehr einzeln isoliert und anschließend in Fosmid-DNA-Pools zusammengefasst, sondern es wurden 24 Klone angezogen, die nach Induktion vereinigt wurden (je 0,5 ml). Daraus wurde dann ein Fosmid-DNA-Pool isoliert. Der sensitive Rezipient R6 wurde mit 500 ng Fosmid-DNA eines Pools transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektiert. Das Screeningverfahren verlief wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Insgesamt konnten zwei Fosmide (Fosmid M-C8 und Fosmid S-E11) identifiziert werden, die bei genetischer Transformation eine Vancoresmycinresistenz auf den sensitiven Rezipienten R6 übertrugen. Dabei betrug die Transformationseffizienz bei Transformation des Fosmides M-C8 0,0003%. Im Vergleich dazu betrug die Transformationseffizienz bei Transformation von 400 ng genomischer DNA der Mutante aR6 0,13%. Die Transformationseffizienz bei Transformation des Fosmides S-E11 betrug 0,002%. Im Vergleich dazu lag die Transformationseffizienz bei Transformation von 400 ng genomischer DNA der Mutante aR6 bei 1,9%.

Die entsprechenden Sequenzen im Genom von *S. pneumoniae* R6 wurden wiederum durch Ansequenzierung der Fosmide mit den Primern #2uni\_fwd und #2uni\_rev bestimmt. Das Fosmidinsert des Fosmides M-C8 umfasste den *S. pneumoniae* R6 Bereich von bp 1.655.207 bis bp 1.691.566 (Genbanknummer: AE007317; Abb. 3. 12). Die Sequenz des Fosmides S-E11 konnte nicht genau identifiziert werden, da sich dieses Fosmid aus zwei ligierten kleineren Fragmenten zusammensetzte. Durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung konnte jedoch gezeigt werden, dass mind. 15 kb des Inserts des Fosmides S-E11 der Sequenz des Fosmides M-C8 entsprechen (R6-Sequenz: bp 1.658.164 bis bp 1.672.973).

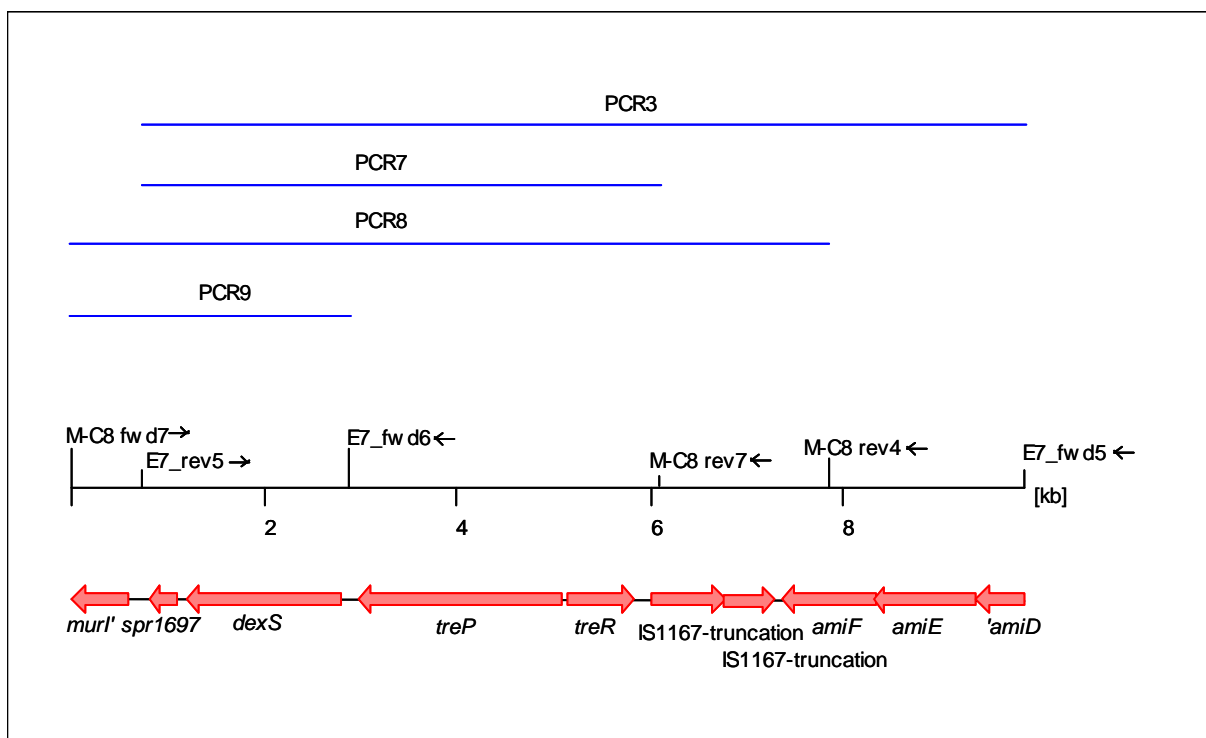


**Abb. 3. 12: Genkarte Fosmid M-C8**

Gezeigt ist die genetische Organisation der in das Fosmid M-C8 klonierten Region aus *S. pneumoniae* R6. Die Lage, der mit den angegebenen Primern amplifizierten PCR Produkte (PCR1-PCR6), ist ebenfalls aufgeführt.

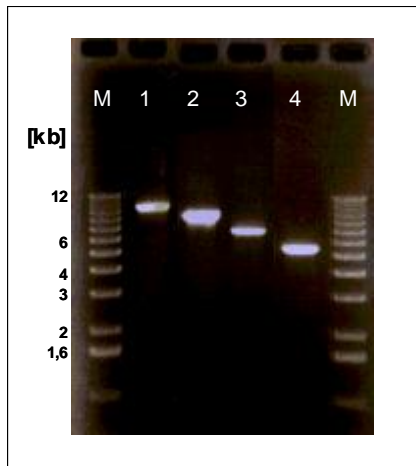
Während des Screeningverfahrens wurde zuerst das Fosmid M-C8 identifiziert und analysiert. Mit Hilfe dieser im Folgenden beschriebenen Resultate wurde dann auch das Fosmid S-E11 bearbeitet. An Hand der ermittelten DNA-Sequenz des Fosmides M-C8 wurden überlappende PCR-Produkte (PCR1, PCR2, PCR3, PCR4, PCR5 und PCR6) mit den in Abb. 3. 12 angegebenen Primern amplifiziert. Die überlappenden Bereiche waren auf beiden Seiten etwa 1 kb. Der sensitive Rezipient wurde mit je 100 ng PCR-Produkt transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Es wurden nur Transformanten bei der Transformation mit PCR-Produkt PCR3 erhalten. Die Transformationseffizienz war sehr gering (0,001%).

Anschließend wurden zwei weitere PCR-Produkte, PCR7 und PCR8, amplifiziert (Abb. 3. 13) (PCR7: Primer E7\_rev5 und M-C8\_rev7; PCR8: Primer M-C8\_fwd7 und M-C8\_rev4). Allerdings stimmten die Bandengröße der amplifizierten PCR-Produkte PCR7 und PCR8 nicht mit den errechneten Größen von 5,4 kb bzw. 7,9 kb überein (Abb. 3. 14). Dieses Ergebnis deutete schon darauf hin, dass eine Insertion statt gefunden haben könnte.



**Abb. 3. 13: Ausschnitt aus dem Fosmidinsert des Fosmides M-C8**

Zur Amplifikation der PCR-Produkte PCR7, PCR8 und PCR9 (blaue Linien) wurden die in der Abbildung eingezeichneten Primer verwendet.

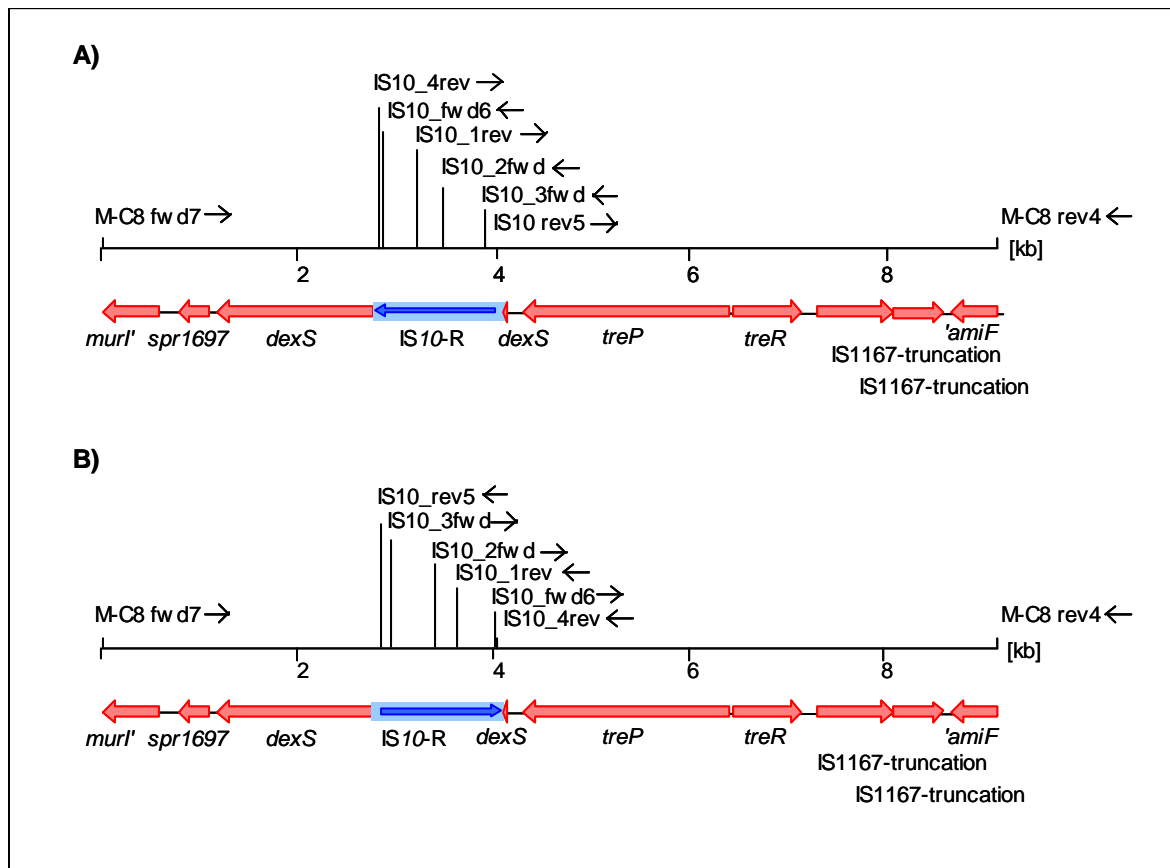


**Abb. 3. 14: Amplifikation der PCR-Produkte PCR7 und PCR8**

In Spur 1 und 2 sind die PCR-Produkte PCR8, amplifiziert von Fosmid M-C8-DNA bzw. genomischer DNA des Stammes R6, und in Spur 3 und 4 die PCR-Produkte PCR7, amplifiziert von Fosmid M-C8-DNA bzw. genomischer DNA des Stammes R6 zu sehen (M=Marker).

Da bereits das IS-Element *IS10-R* im Fosmid E/C2 identifiziert worden war, wurde eine PCR zum Nachweis des *IS10-R* durchgeführt. Da die Orientierung und die genaue Lokalisierung des IS-Elementes noch nicht bekannt waren, wurden verschiedene Primerpaare ausgewählt, die zunächst die Orientierung des *IS10-R* aufklären sollten. Mit Hilfe der Primerpaare *IS10\_2fwd* und *M-C8rev4*, *IS10\_2fwd* und *MC8\_fwd7*, *IS10\_1rev* und *M-C8\_rev4* sowie *IS10\_1rev* und *MC8\_fwd7* wurden PCRs angesetzt (Abb. 3. 15; Beispiel der Integration). Nur bei Verwendung der Primerpaare *IS10\_2fwd* und *MC8\_fwd7* bzw. *IS10\_1rev* und *MC8\_rev4* wurden PCR-Produkte generiert, d.h. das *IS10-R* inserierte wie in Fall A) in Abb. 3. 15 gezeigt. Durch Sequenzierung mit den Primern *IS10\_fwd6* bzw. *IS10\_rev5* (Abb. 3. 15) wurden die genauen Insertionsstellen bestimmt (Abb. 3. 16).

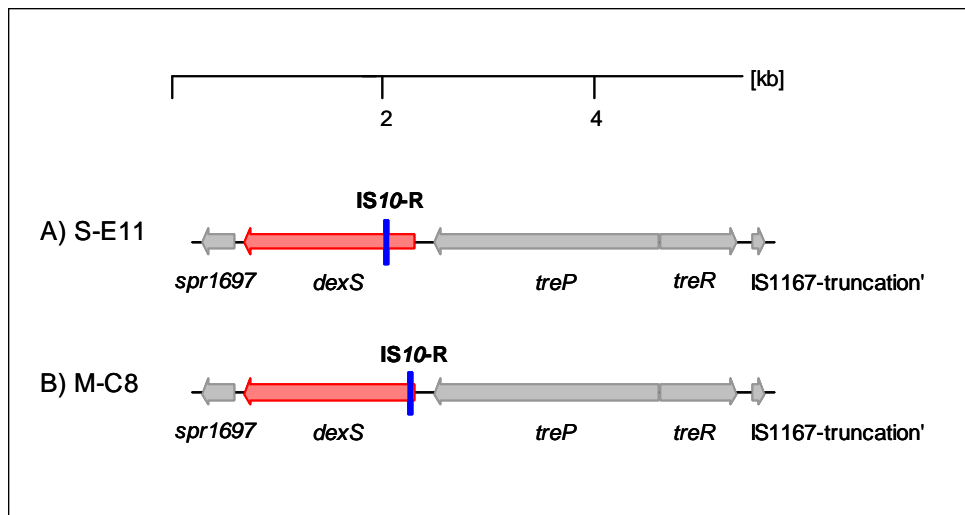




**Abb. 3. 15: Möglichkeiten der Integration von IS10-R in die Region des Gens *dexS***

Durch eine PCR wurde die Orientierung des Insertionselementes IS10-R (hellblau; der blaue Pfeil steht für das Transposase codierende Gen *tnp*) bestimmt. Die Lage der Oligonukleotide, die zur Amplifikation und zur nachfolgenden Sequenzierung verwendet wurden, sind eingezeichnet.

Da in dem Fosmid M-C8 eine IS10-R-Insertion in das Gen *dexS* identifiziert worden war, und da das Fosmidinsert des Fosmides S-E11 unter anderem auch das Gen *dexS* umfasste, wurden ebenfalls die PCR-Produkte PCR7 und PCR8 von Fosmid S-E11 amplifiziert (Abb. 3. 13). Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass die PCR-Produkte ca. 1,3 kb größer waren als die zuvor errechneten Größen von 5,4 kb bzw. 7,9 kb. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass auch hier ein IS-Element insertiert sein könnte. Eine Kontroll-PCR mit anschließender Sequenzierung bestätigte die Insertion des IS10-R in das Gen *dexS*. Dabei wurden zur Bestimmung der Orientierung und der Integration des IS10-R die gleichen Primer verwendet, wie sie in Abb. 3. 15 aufgeführt sind. In Abb. 3. 16 ist die jeweilige Insertionsstelle des IS10-R im Fosmid M-C8 bzw. S-E11 veranschaulicht. Eine detaillierte Beschreibung der Insertion des IS10-R folgt in Kapitel 3.2.2.2.



**Abb. 3. 16: Insertionsstellen des IS10-R in das Gen *dexS***

A) Insertionsstelle des IS10-R (blaue Markierung) in das Gen *dexS* (rot) im Fosmid S-E11

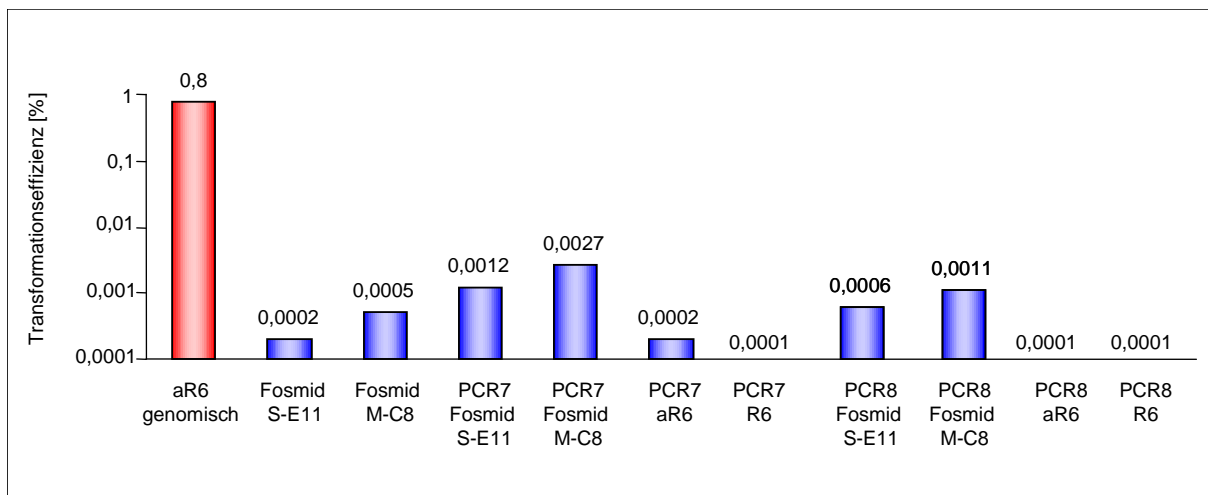
B) Insertionsstellen des IS10-R (blaue Markierung) in das Gen *dexS* (rot) im Fosmid M-C8

Zur Bestätigung, dass die durch IS10-R modifizierten Gene *dexS* für die erhöhte Vancoresmycinresistenz verantwortlich sind, sollte ein Transformationsexperiment durchgeführt werden, bei dem der sensitive Rezipient R6 mit den PCR-Produkten PCR7 und PCR8 transformiert wird. Diese PCR-Produkte wurden ebenfalls von genomischer DNA der Mutante aR6 und des Referenzstammes R6 amplifiziert und in die nachfolgende Transformation eingesetzt. Der Rezipient R6 wurde mit je 100 ng Fosmid-DNA der Fosmide S-E11 und M-C8, den PCR-Produkten PCR7 und PCR8, die jeweils von Fosmid S-E11, Fosmid M-C8, genomischer DNA der Mutante aR6 und genomischer DNA des Referenzstammes R6 amplifiziert worden waren, transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Als Positivkontrolle diente genomische DNA der Mutante aR6 (400 ng).

Wie aus der Abb. 3. 17 hervorgeht, übertragen die Fosmide M-C8 und S-E11 eine Vancoresmycinresistenz auf den Rezipienten R6. Allerdings ist die Transformationseffizienz mit 0,0005% bei Fosmid M-C8 und mit 0,0002% bei Fosmid S-E11 sehr gering. Die PCR-Produkte PCR7 und PCR8, amplifiziert von den Fosmiden M-C8 bzw. S-E11, übertrugen ebenfalls eine Vancoresmycinresistenz auf den Stamm R6. Die Transformationseffizienzen sind etwas höher als bei Transformation der entsprechenden Fosmide, was daran lag, dass bei gleicher Menge transformierter DNA, entsprechend mehr DNA-Sequenz der resistenzvermittelnden Determinante vorlag. Durch Transformation der PCR-Produkte PCR7 und PCR8, amplifiziert von genomischer DNA der Mutante aR6 bzw. des Referenzstammes R6 (Negativkontrolle), konnten keine Transformanten erhalten werden. Dadurch war gezeigt

worden, dass das Gen *dexS* der Mutante aR6 nicht in eine Resistenz gegen Vancoresmycin involviert ist.

In beiden Fosmiden insertierte das IS<sub>10</sub>-R in das Gen *dexS*, jedoch an unterschiedlichen Stellen. Dadurch wurde eine Resistenzhöhung gegen Vancoresmycin erzielt. Eine genauere Charakterisierung der IS<sub>10</sub>-R-Insertionen und deren Auswirkungen erfolgt in Kapitel 3.2.2.2.



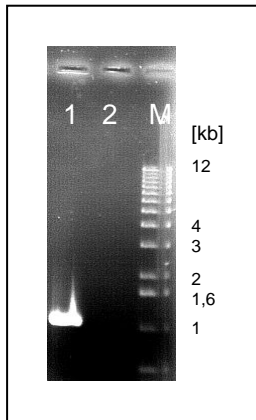
**Abb. 3. 17: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6**

Der sensitive Rezipient R6 wurde mit genomischer DNA der Mutante aR6 (rot, Positivkontrolle), mit Fosmid-DNA der Fosmide S-E11 und M-C8, mit den PCR-Produkten PCR7 und PCR8, die jeweils ausgehend von den Fosmiden Fosmid S-E11, Fosmid M-C8, genomischer DNA der Mutante aR6 und des Referenzstammes R6 amplifiziert wurden, transformiert (blau) und auf Vancoresmycin selektioniert.

Im Anschluss an dieses Transformationsexperimentes wurde jeweils ein weiteres PCR-Produkt von den Fosmiden M-C8 und S-E11 mit den Primern M-C8\_fwd7 und E7\_fwd6 generiert (PCR9; siehe Abb. 3. 13). Die PCR-Produkte, die eine Größe von 2,9 kb aufweisen sollten, waren durch die Insertion des IS<sub>10</sub>-R um 1,3 kb größer. Der sensitive Rezipient R6 wurde mit je 100 ng PCR-Produkt transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Die Transformationseffizienzen betragen 0,0033% (PCR9 amplifiziert von Fosmid M-C8) und 0,0028% (PCR9, amplifiziert von Fosmid S-E11). Aus diesem Transformationsexperiment wurden Transformanten abgeimpft und als Glycerindauerkultur konserviert. Die Integration des IS<sub>10</sub>-R wurde durch eine Kontroll-PCR (Primer: E7\_rev5 und E7\_fwd6) bestätigt. Die Stämme wurden als R6-*dexS*::IS<sub>10</sub>-R\_A (S-E11) und R6-*dexS*::IS<sub>10</sub>-R\_B (M-C8) bezeichnet.

Aufgrund der Tatsache, dass das IS-Element IS<sub>10</sub>-R in drei Fosmiden detektiert und dieses Element in *S. pneumoniae* zuvor nicht beschrieben worden war, sollte die Quelle des IS<sub>10</sub>-R aufgeklärt werden. Mit IS<sub>10</sub>-R spezifischen Primern (Primer: IS10\_3fwd und IS10\_4rev)

wurde eine Kolonie-PCR ausgehend von dem Wirtsstamm *E. coli* EPI300™ durchgeführt. Da ein 1,1 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden konnte (Abb. 3. 18), wurde bestätigt, dass das IS10-R aus dem Wirtsorganismus *E. coli* EPI300™ stammte.



**Abb. 3. 18: Nachweis des IS10-R in *E. coli* EPI300™**

Amplifiziert wurde ein 1,1 kb großes PCR-Produkt mit IS10-R spezifischen Primern. In Spur 1 wurde das PCR-Produkt der Kolonie-PCR ausgehend von dem Stamm *E. coli* EPI300™-T1<sup>R</sup> aufgetragen, in Spur zwei ein PCR-Ansatz ohne template als Negativkontrolle (M=Marker).

Zur Überprüfung, inwieweit die zweite erstellte Fosmidgenbank repräsentativ verschiedene Gene des *S. pneumoniae* Genoms beinhaltet, wurden willkürlich fünf Gene ausgewählt, die durch ein PCR-Produkt nachgewiesen werden sollten. Als template dienten zwölf bzw. 24 Fosmid-DNA-Pools mit je 24 Einzelfosmiden (Tab. 3. 2). Es wurden die in Tab. 3. 2 aufgeführten Gene mit den genannten Oligonukleotiden amplifiziert.

**Tab. 3. 2: Nachweis verschiedener Gene in der erstellten Fosmidgenbank**

Die in Spalte 1 aufgeführten Gene wurden mit den angegebenen Oligonukleotiden ausgehend von 12 bzw. 24 Fosmidpools amplifiziert und nachgewiesen.

Gene	Größe [kb]	Oligo-nukleotide	Anzahl getesteter Pools	Anzahl der Nachweise
<i>gpmB</i>	1,9	<i>gpmB</i> 1, <i>gpmB</i> 4	12 á 24 Fosmide	2
<i>spr294, spr295</i>	1,1	#2hand4fwd, #2hand3rev	12 á 24 Fosmide	9
<i>dexS</i>	2,1	E7_rev5, E7_fwd6	12 á 24 Fosmide	3
<i>rpsI</i>	1,6	E/C2_8fwd, E/C2_7rev	12 á 24 Fosmide	5
<i>pbp2A</i>	2,5	<i>pbp2a</i> _1U, <i>pbp2a</i> _2268r	24 á 24 Fosmide	3

Das Gen *gpmB* wurde zweimal, die Gene *spr294-spr295* neunmal, das Gen *dexS* dreimal und das Gen *rpsI* fünfmal in zwölf Pools identifiziert. Das Gen *pbp2A* konnte in diesen zwölf Pools nicht amplifiziert werden, weshalb weitere zwölf Pools getestet wurden, in denen das Gen *pbp2A* dreimal nachgewiesen werden konnte. Durch dieses Experiment konnte gezeigt

werden, dass fünf willkürlich ausgesuchte Gene in der erstellten Genbank gefunden werden konnten.

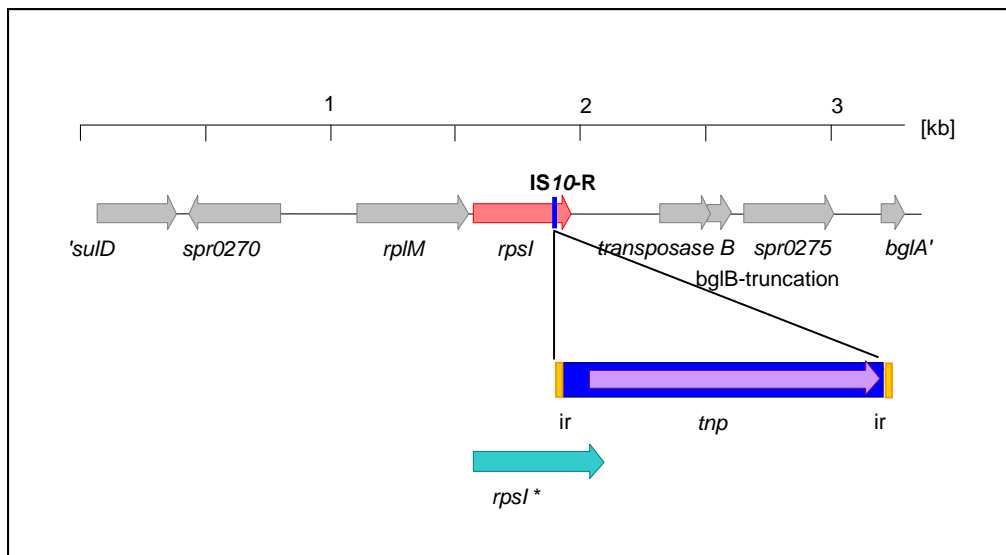
### 3.2.2 Analyse der Resistenzdeterminanten *rpsI* und *dexS*

Mit Hilfe der Fosmidgenbanken konnten drei Fosmide ermittelt werden, die dem sensitiven Rezipienten *S. pneumoniae* R6 durch Transformation eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin übertragen. Durch Sequenzierung und Amplifizierung eines PCR-Produktes mit IS10-R spezifischen Primern wurde in allen drei Fosmiden das Insertionselement IS10-R nachgewiesen. Dieses IS-Element ist Teil des Transposons Tn10, das ursprünglich aus *Shigella flexneri* stammt (Chalmers *et al.*, 2000). Tn10 enthält neben zwei IS10-Elementen eine Tetracyclinresistenzkassette, die seit langem zur Konstruktion von Bakterienstämmen verwendet wird. Unter anderem wurde Tn10 bei der Konstruktion von *E. coli* DH10B eingesetzt (Hill *et al.*, 2000; Kleckner *et al.*, 1977), der vermutlich ein Vorläufer des hier verwendeten Wirtsstammes *E. coli* EPI300<sup>TM</sup> (Wild *et al.*, 2002; Herstellerangaben) ist. Beide IS-Elemente können aufgrund einer vorhandenen Transposase eigenständig insertieren, wobei IS10-L wesentlich ineffizienter transponiert als IS10-R. IS10-R hat eine Länge von 1329 bp, wobei die Sequenz von fast perfekten 23 bp langen 'inverted repeats' flankiert wird (Halling *et al.*, 1982). Es beinhaltet ein Gen, das für eine Transposase codiert, die für das Transponieren verantwortlich ist. Die Transposition des Tn10 bzw. des IS10-R verläuft nicht-replikativ, d. h. das transponierbare Element wird aus dem Genom ausgeschnitten und an einer anderen Stelle wieder eingesetzt. Durch diesen sog. 'cut and paste'-Vorgang kommt es an der Insertionsstelle zur Verdopplung der Zielsequenz.

#### 3.2.2.1 Insertion des IS10-R in das Gen *rpsI*

Das Gen *rpsI* in *S. pneumoniae* besitzt eine Länge von 393 bp, das für das 130 AS lange Protein S9 der kleinen ribosomalen Untereinheit codiert. Das Protein befindet sich an der Grenzfläche der beiden Untereinheiten und ist in deren Assoziation involviert. Seine Gegenwart ist außerdem erforderlich für die Ribosomen abhängige GTPase-Aktivität des Elongationsfaktors EF-G (Chen & Wittmann-Liebold, 1975).

Das IS10-R transponierte 373 bp stromabwärts des 5'-Endes von *rpsI* nach der Zielsequenz 5' CGT AAA GCA 3', die sich dadurch verdoppelte. Das ursprüngliche Genprodukt, das sich aus 130 AS zusammensetzte, bestand nun aus 179 AS. Durch das Insertionselement wurden die sechs ursprünglichen AS am C-terminalen Ende durch 55 neue, überwiegend hydrophobe AS ersetzt. Die genetische Umgebung um das Gen *rpsI* und die Insertion des IS10-R ist in Abb. 3. 19 veranschaulicht.

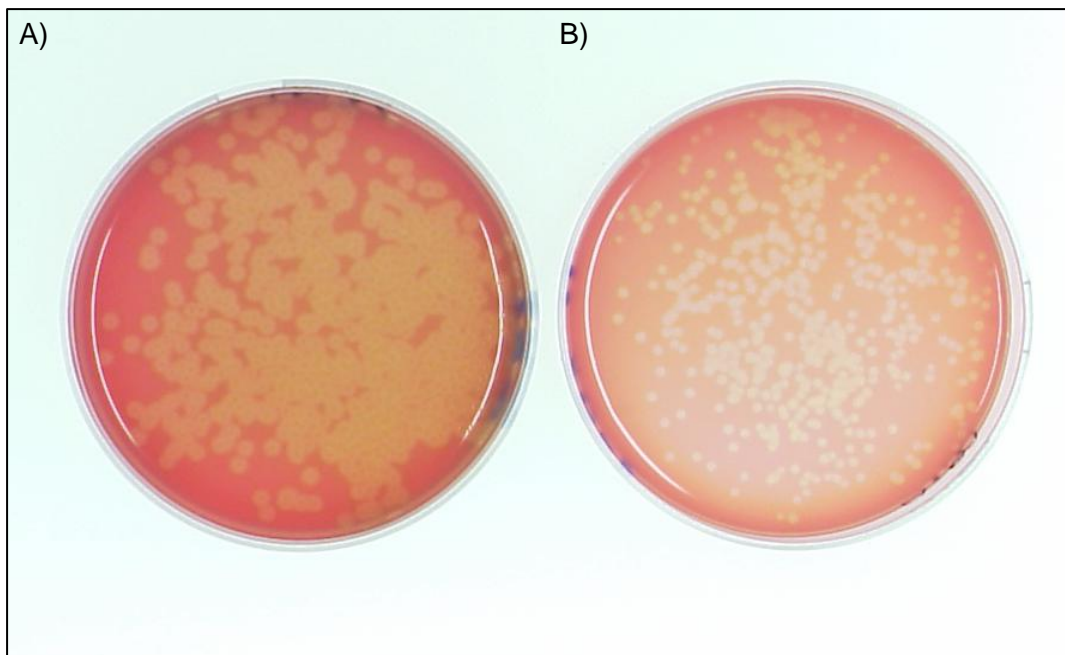


**Abb. 3. 19: Genetische Organisation der Integration des IS10-R in das Gen *rpsI***

373 bp nach dem 5'-Ende des Genes *rpsI* (rot) insertierte das IS10-R (blau). Das IS10-R enthält nicht perfekte inverted repeats (IR, orange) und ein Gen (*tnp*, lila), das für eine Transposase codiert. Das Fusionsgen *rpsI\** (türkis) besitzt 540 bp.

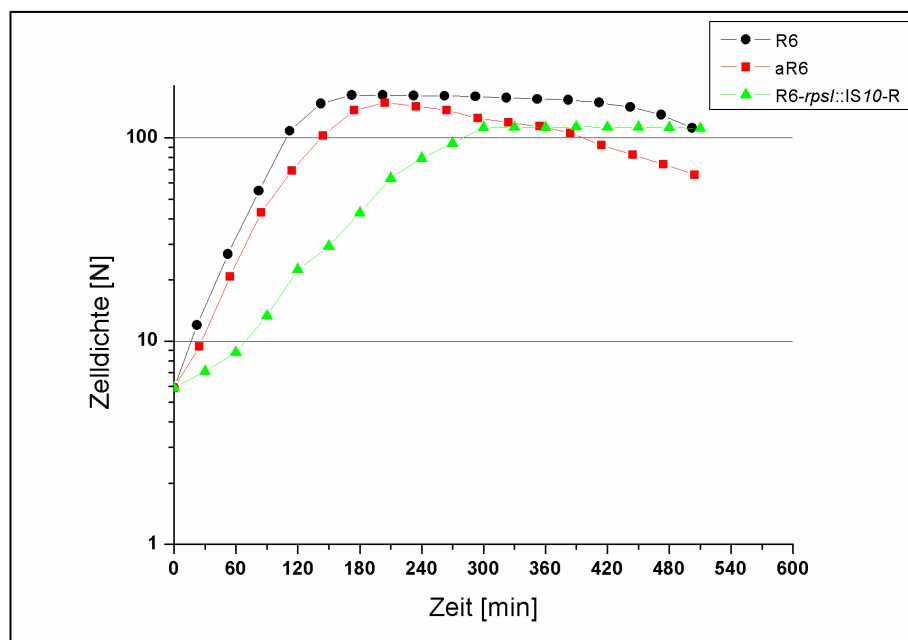
Durch Transformation des 4,5 kb großen PCR-Produktes '*rpsI*::IS10-R' (Primer: #2uni\_fwd, E/C2\_5rev), auf dem sich das Gen *rpsI* mit dem insertierten IS10-R befand, wurden Transformanten erhalten (R6-*rpsI*::IS10-R), deren Koloniemorphologie sich von der der Positivkontrolle unterschied. Verglichen wurden die IS10-R Transformanten mit Transformanten, die mit genomischer DNA der Mutante aR6 transformiert worden waren (Positivkontrolle). Die Transformanten waren erst nach 48 h sichtbar, im Gegensatz zu den Transformanten der Positivkontrolle, die nach 24 h identifiziert werden konnten. Der Durchmesser der Kolonien der R6-*rpsI*::IS10-R-Transformanten war deutlich kleiner als der der Positivkontrolle (Abb. 3. 20).

Da das Wachstum der R6-*rpsI*::IS10-R-Transformanten auf D-Blutagarplatten sehr langsam verlief, wurde das Wachstumsverhalten in Flüssigkultur untersucht. Es wurden die Stämme R6-*rpsI*::IS10-R, R6 und aR6 verglichen (Abb. 3. 21). Der Stamm R6-*rpsI*::IS10-R hatte eine Generationszeit von 59 min. Im Vergleich dazu hatte der Referenzstamm R6 eine Generationszeit von 33 min und die Mutante aR6 eine Generationszeit von 35 min. Die Generationszeit des Stammes R6-*rpsI*::IS10-R war somit fast doppelt so lang als die des Referenzstammes R6 bzw. der Mutante aR6.



**Abb. 3. 20: Koloniemorphologie von Transformanten R6-*rpsI*::IS10-R**

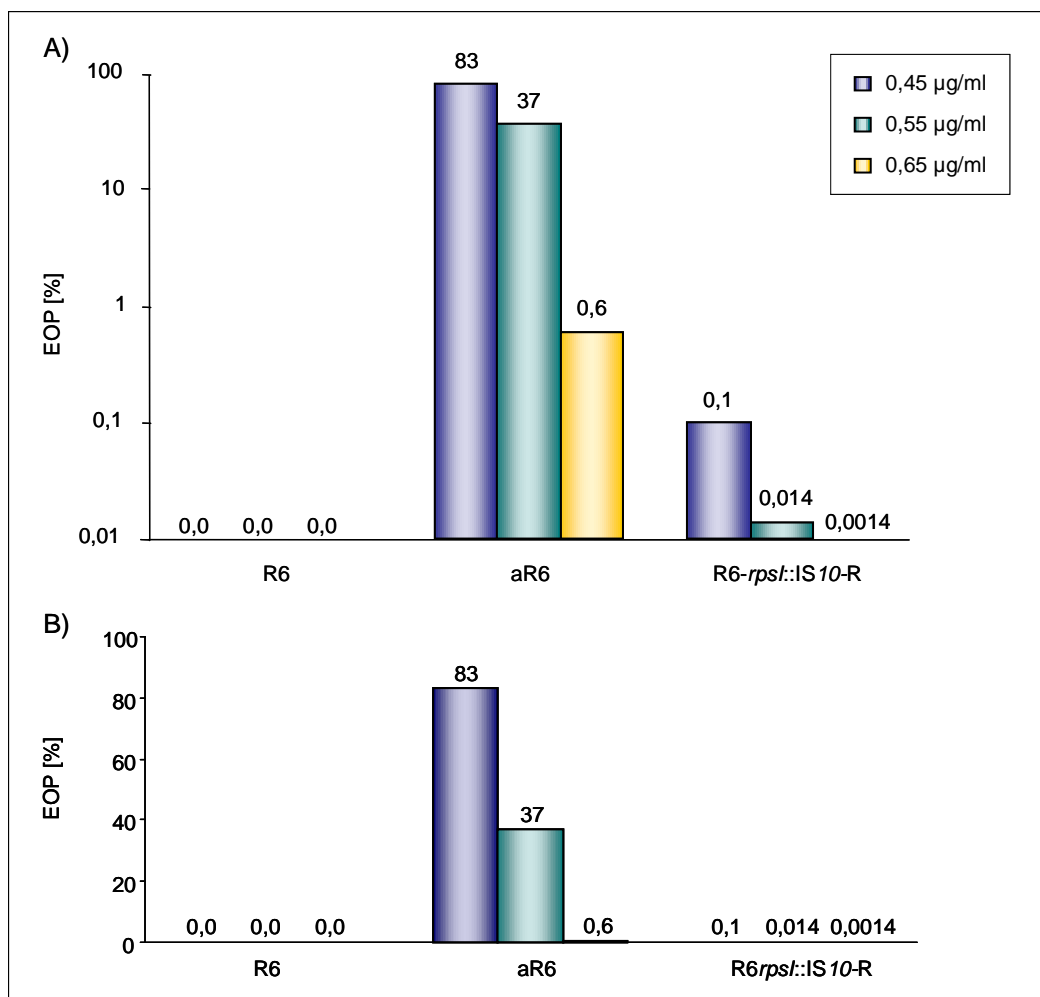
Auf der linken Platte A) befinden sich Transformanten, die mit genomischer DNA der Mutante aR6 transformiert wurden, auf der rechten Platte B) Transformanten, die mit dem PCR-Produkt '*rpsI*::IS10-R' transformiert wurden.



**Abb. 3. 21: Wachstumsverhalten des Stammes R6-*rpsI*::IS10-R im Vergleich zu dem Referenzstamm R6 und der Mutante aR6**

Verglichen wurde das Wachstumsverhalten in C-Medium der Stämme R6 (schwarz), aR6 (rot) und R6-*rpsI*::IS10-R (grün) (halblogarithmische Darstellung).

Parallel dazu wurde eine Bestimmung der Plattierungseffizienz (EOP, efficiency of plating) der Stämme R6, aR6 und R6-*rpsI*::IS10-R auf steigenden Konzentrationen Vancoresmycin durchgeführt (Abb. 3. 22). Die Mutante aR6, die als Positivkontrolle fungierte, wies eine EOP von 83% auf 0,45 µg/ml Vancoresmycin, von 37% auf 0,55 µg/ml Vancoresmycin und von 0,61% auf 0,65 µg/ml Vancoresmycin auf. Im Vergleich dazu zeigte der Stamm R6-*rpsI*::IS10-R eine EOP von 0,1% auf 0,45 mg/ml Vancoresmycin, von 0,014% auf 0,55 µg/ml Vancoresmycin und von 0,0014% auf 0,65 µg/ml Vancoresmycin. Das Wachstum der Negativkontrolle R6 war bei allen Konzentrationen inhibiert. Der Stamm R6-*rpsI*::IS10-R wies zwar eine höhere EOP als die Negativkontrolle R6 auf, aber sie reichte bei weitem nicht an die EOP der Mutante aR6 heran.



**Abb. 3. 22: Bestimmung der EOP des Stammes R6-*rpsI*::IS10-R im Vergleich zu dem Referenzstamm R6 und der Mutante aR6 für Vancoresmycin**

Die EOP wurde für die Stämme R6 (Negativkontrolle), aR6 (Positivkontrolle) und R6-*rpsI*::IS10-R auf D-Blutagarplatten mit 0,45 µg/ml (blau), 0,55 µg/ml (grün) und 0,65 µg/ml (gelb) Vancoresmycin bestimmt ( A) halblogarithmische Skalierung; B) normale Skalierung).



Da das Gen *rpsI* durch Insertion des IS10-R aufgefallen war, wurde überprüft, ob eine Mutation in diesem Gen in der Mutante aR6 vorlag. Dazu wurde dieses Gen mit flankierenden Bereichen amplifiziert (Primer: E/C2\_7rev und E/C2\_8fwd) und durch Transformation des sensitiven Rezipienten R6 auf Resistenzübertragung getestet. Daneben wurde das Gen sequenziert. Es konnten weder Transformanten erhalten werden, noch konnte eine Sequenzabweichung verglichen mit der *S. pneumoniae* R6 Sequenz identifiziert werden. Das bedeutet, dass das Gen *rpsI* der Mutante aR6 nicht an der erhöhten Resistenz gegen Vancoresmycin der Mutante aR6 beteiligt ist. Da gezeigt wurde, dass das im Stamm R6-*rpsI*::IS10-R veränderte Gen *rpsI* eine leichte Resistenzerhöhung gegen Vancoresmycin auslöst und dass das Gen *rpsI* der Mutante aR6 nicht an einer Resistenzentwicklung gegen Vancoresmycin beteiligt ist, wurden keine weiteren Experimente mehr im Hinblick auf das Gen *rpsI* durchgeführt.

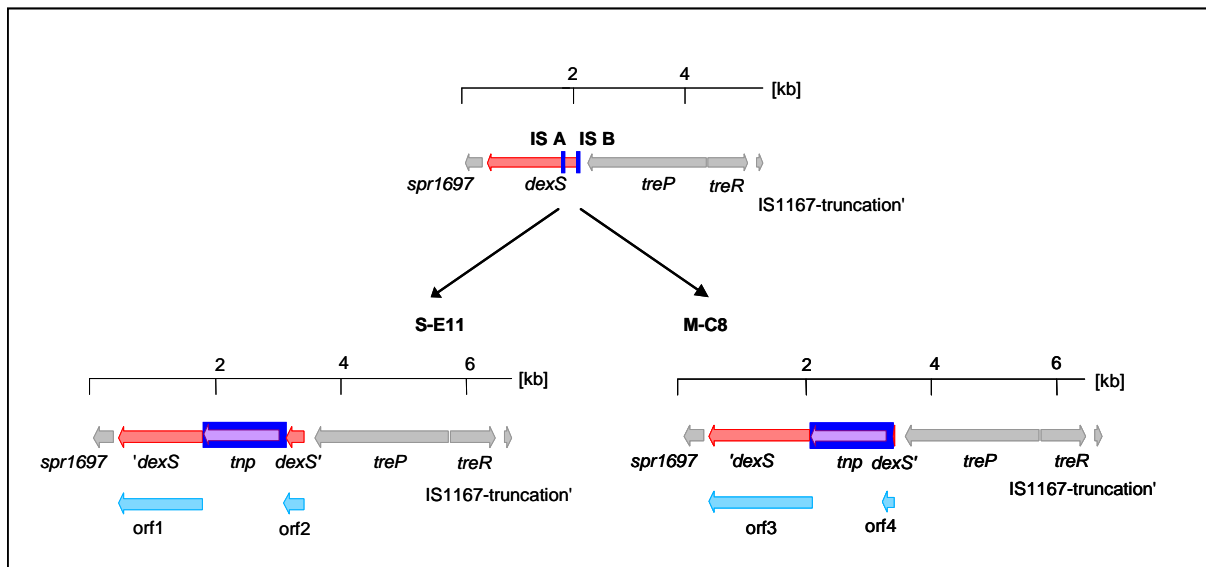
### 3.2.2.2 Insertion des IS10-R in das Gen *dexS*

Das Gen *dexS* hat eine Länge von 1626 bp und codiert für ein 541 AS großes Protein. Durch Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der BLAST-Datenbank, konnten Homologien zu Glucosidasen und  $\alpha$ -Amylasen gefunden werden. DexS wird den Dextranglucosidasen zugeordnet, die gemäß der IUBMB-Enzymklassifizierung zu der Enzymklasse E. C. 3.2.1.11 zählen. Dextranasen hydrolysieren 1,6- $\alpha$ -glucosidische Bindungen in dem Polymer Dextran. Es wurden hohe Homologien zu verwandten Proteinen in anderen *Streptococccen* festgestellt. Allerdings wurde dieses Protein in *S. pneumoniae* kaum experimentell untersucht. Vermutlich ist es in den Trehalose-Phosphat-Zuckermetabolismus involviert. DexS zeigt unter anderem Homologie zu dem Protein TreA aus *S. mutans* (75% Identität, bezogen auf 538 verglichene AS) und zu dem Protein DexS aus *S. sanguinis* (80% Identität, bezogen auf 540 verglichene AS) (siehe Abb. 4. 2). Das Gen *dexS* ist möglicherweise Teil eines Operons, das sich aus den Genen *treP*, *dexS* und *spr1697* zusammensetzt (Abb. 3. 23). Das Operon könnte durch den Transkriptionsregulator TreR, der durch *treR* codiert wird, reguliert werden. Das *treP*-Genprodukt besitzt eine konservierte Domäne (PRK 11007), die bei Genprodukten zu finden ist, die an Trehalosespezifischen Phosphotransferasesystemen beteiligt sind. Die Funktion des Genproduktes, das durch *spr1697* codiert wird, konnte aufgrund nicht vorhandener Homologien nicht erschlossen werden. Es könnte sich dabei um ein Transmembranprotein handeln.

Wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben wurde, konnten zwei Fosmide, M-C8 und S-E11, identifiziert werden, die bei Transformation des sensitiven Rezipienten R6 Resistenz gegen Vancoresmycin vermitteln. Mit IS-spezifischen Primern (IS\_fwd6 und IS\_rev5) wurde die Integrationsstelle des IS10-R im Gen *dexS* durch Sequenzierung bestimmt. In der Abb. 3.

23 sind die genetischen Auswirkungen der Insertion verdeutlicht. Im Fall der Insertion A (Fosmid S-E11: Abb. 3. 23, links) insertierte das IS10-R an der Sequenz 5' TGC TGG ACA 3', die sich dadurch verdoppelte, 289 bp vom 5' Ende des Genes. Das daraus resultierende orf2-Genprodukt setzt sich aus 108 AS zusammen, wobei die ersten 96 AS von dem unterbrochenen *dexS* und die letzten 12 AS von dem IS10-R codiert werden. Nach der Insertionsstelle wurde der orf1 identifiziert, der für ein mögliches Fusionsgenprodukt von 445 AS codieren könnte. Im Fall der Insertion B (Fosmid M-C8: Abb. 3. 23, rechts) insertierte das IS10-R 27 bp vom 5' Ende entfernt an der Sequenz 5' AAA GTA GTC 3', die sich dadurch verdoppelte. Das resultierende Genprodukt Orf4 setzt sich aus 9 ursprünglichen AS von *DexS* und 55 AS, welche von dem IS10-R codiert werden, zusammen. orf3 könnte für ein mögliches Fusionsgenprodukt von 548 AS codieren.

Sowohl vor orf1 als auch vor orf 3 konnte keine Ribosomenbindestelle identifiziert werden, so dass beide orfs vermutlich nicht translatiert werden.



**Abb. 3. 23: Genetische Organisation der Integration des IS10-R in das Gen *dexS***

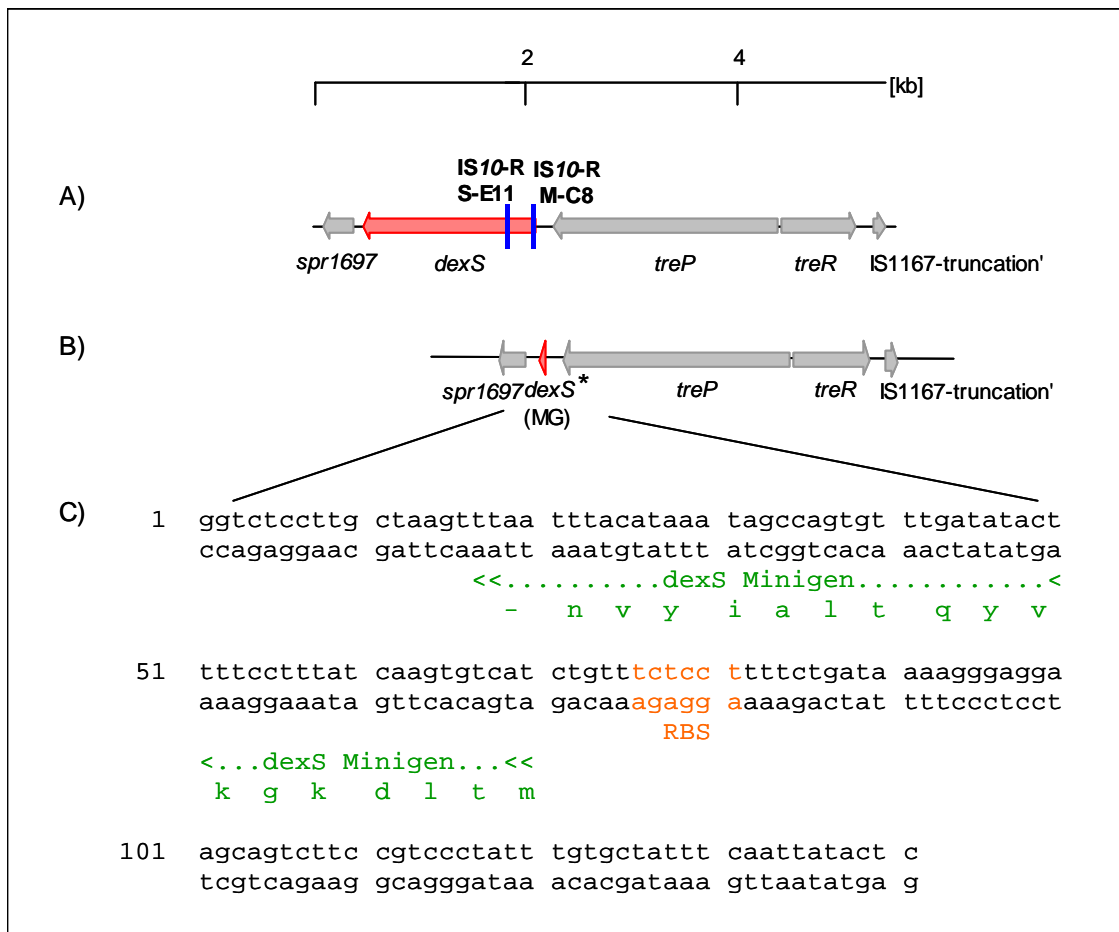
In der oberen Hälfte ist die genetische Organisation der Region um das Gen *dexS* dargestellt. Die beiden blauen Balken, die mit IS A bzw. IS B gekennzeichnet sind, geben die jeweiligen Insertionsstellen des IS10-R an. In der unteren Hälfte wird die genetische Organisation im Fall der Insertion A (links) bzw. B (rechts) verdeutlicht. Die hellblauen Pfeile stellen mögliche orfs dar. Das vollständige Insertionselement IS10-R ist blau markiert, das Gen *tnp* violett.

In Kapitel 3.2.1.3 wurde gezeigt, dass vancoresmycinresistente Transformanten erhalten wurden, indem der sensitive Rezipient R6 mit DNA der Fosmide M-C8 bzw. S-E11 transformiert worden war. Ausgehend von den Fosmiden M-C8 und S-E11 wurden jeweils die PCR-Produkte PCR7 und PCR8 amplifiziert, die durch Transformation des Rezipienten R6 ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegen Vancoremeycin übertrugen (siehe Abb. 3. 17).

Angesichts dieser Ergebnisse erschien das Gen *dexS* als mögliche Resistenzdeterminante in Betracht zu kommen, die weiter analysiert werden sollte.

Da die Insertion des IS10-R-Elementes in das Gen *dexS* wahrscheinlich einen Funktionalitätsverlust des Genproduktes DexS zur Folge hat, sollten die Auswirkungen einer Deletion des Genes *dexS* im Referenzstamm R6 auf die Resistenz gegen Vancoresmycin untersucht werden.

Die Deletion des Genes *dexS* wurde mit Hilfe der Janusresistenzkassette (Sung *et al.*, 2001) vorgenommen. Dabei wurde in einem ersten Transformationsschritt das Gen *dexS* in frame durch die Janusresistenzkassette ersetzt, die anschließend in einem zweiten Transformationsschritt durch das Minigen *dexS\** ersetzt wurde (vgl. 2.9; Abb. 3. 24). Das Minigen *dexS\** codiert für die ersten acht N-terminalen AS und für die letzten neun C-terminalen AS des ursprünglichen Proteins DexS.



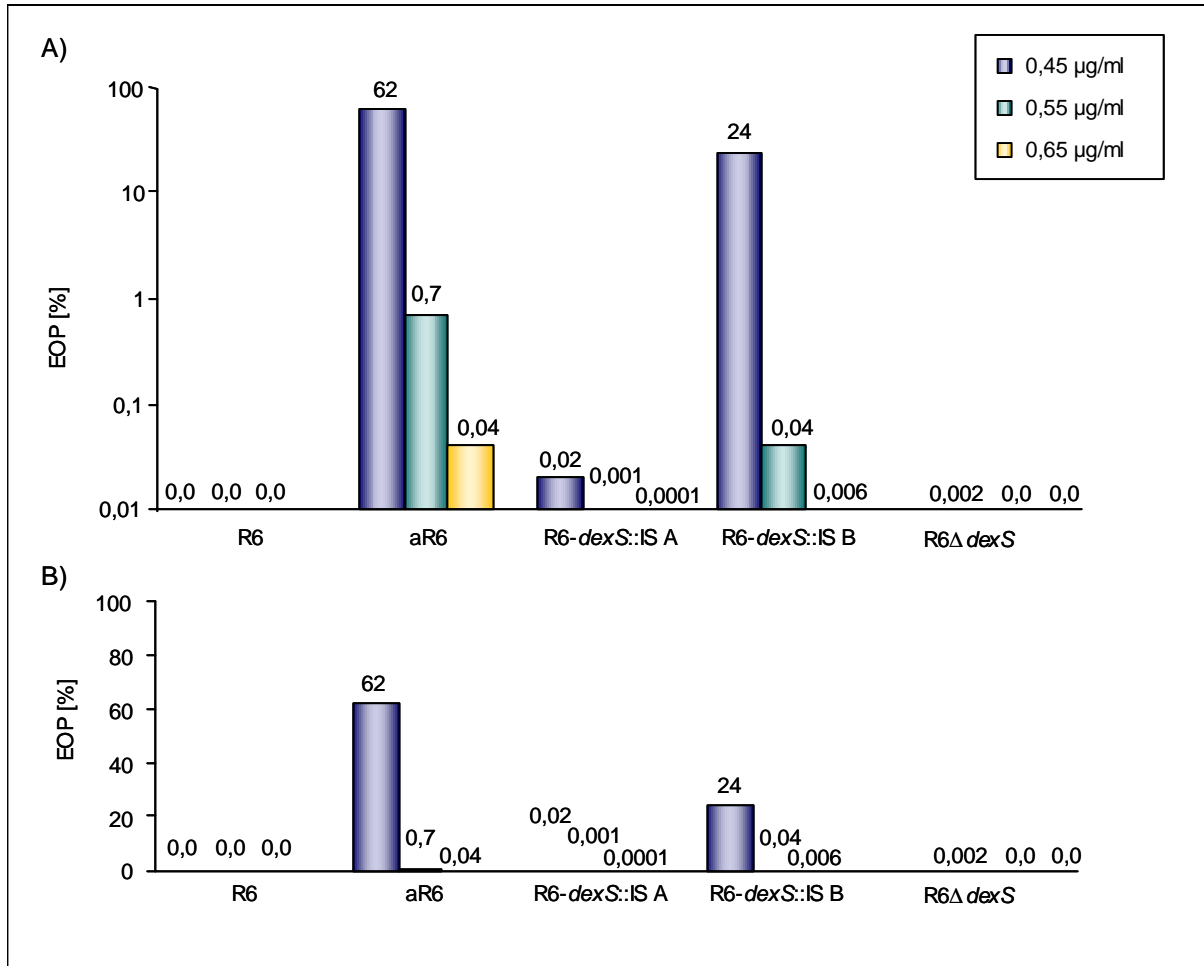
**Abb. 3. 24: Konstruktion des Stammes R6 $\Delta$ *dexS***

A) Genetische Organisation der Region um *dexS* in *S. pneumoniae* R6 vor Stammkonstruktion (blaue Balken: Insertionsstellen IS10-R)

B) Genetische Organisation der Region um *dexS* nach Konstruktion des Stammes R6 $\Delta$ *dexS*

C) DNA-Sequenz des Minigens *dexS\** mit der davon abgeleiteten AS-Sequenz (eine mögliche Ribosomenbindestelle (orange) ist eingezeichnet)

Nach Konstruktion des Stammes  $R6\Delta dexS$  wurde eine EOP auf verschiedenen Konzentrationen Vancoresmycin durchgeführt. Zum Vergleich wurden die EOP der Stämme  $R6-dexS::IS10-R\_A$  (S-E11) und  $R6-dexS::IS10-R\_B$  (M-C8), aR6 als Positivkontrolle und R6 als Negativkontrolle bestimmt (Abb. 3. 25).



**Abb. 3. 25: Bestimmung der EOP der Stämme R6, aR6,  $R6\Delta dexS$ ,  $R6-dexS::IS10-R\_A$  und  $R6-dexS::IS10-R\_B$  für Vancoresmycin**

Es wurden die Stämme R6, aR6,  $R6\Delta dexS$ ,  $R6-dexS::IS10-R\_A$  (=  $R6-dexS::IS\ A$ ) und  $R6-dexS::IS10-R\_B$  (=  $R6-dexS::IS\ B$ ) auf D-Blutagarplatten mit 0,45 µg/ml (blau), 0,55 µg/ml (grün) und 0,65 µg/ml (gelb) Vancoresmycin verglichen ( A) halblogarithmische Skalierung; B) normale Skalierung).

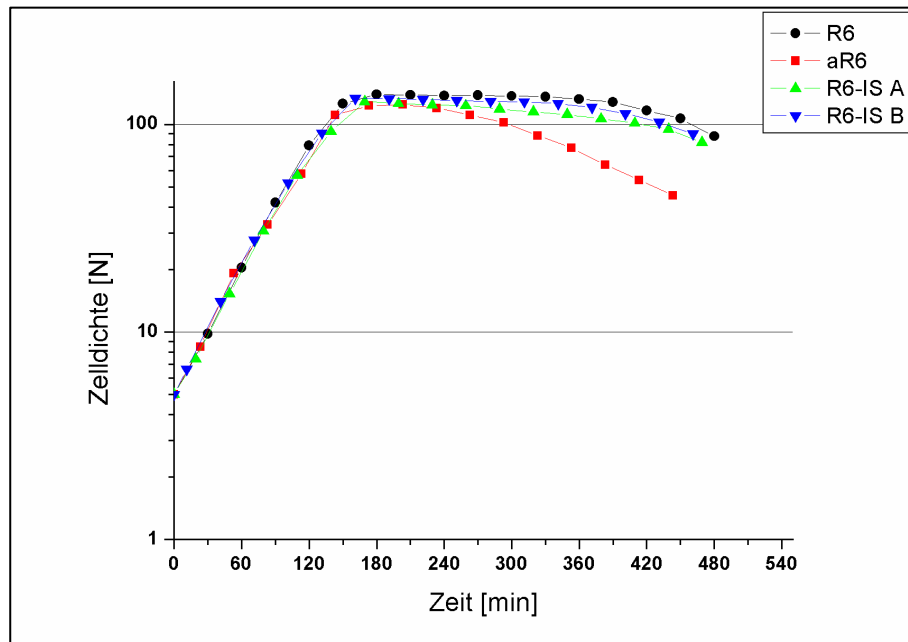
Der Stamm  $R6\Delta dexS$  hatte bei einer Konzentration von 0,45 µg/ml eine EOP von 0,002%, wobei das Wachstum bei 0,55 µg/ml und 0,65 µg/ml Vancoresmycin vollständig inhibiert war. Die EOP betrug für den Stamm  $R6-dexS::IS10-R\_B$  24% auf 0,45 µg/ml, 0,04% auf 0,55 µg/ml bzw. 0,006% auf 0,65 µg/ml, für den Stamm  $R6-dexS::IS10-R\_A$  0,02% auf 0,45 µg/ml, 0,001% auf 0,55 µg/ml bzw. 0,0001% auf 0,65 µg/ml. Die EOP der Mutante aR6 betrug bei einer Konzentration von 0,45 µg/ml Vancoresmycin 62%, bei einer Konzentration von 0,55 µg/ml 0,7% und bei einer Konzentration von 0,65 µg/ml 0,04%. Das Wachstum der Negativkontrolle R6 war vollständig inhibiert. Auffällig sind die erhöhten EOP-Werte des

Stammes R6-*dexS*::IS10-R\_B im Vergleich zum Stamm R6-*dexS*::IS10-R\_A. Durch die Deletion von *dexS* konnte eine sehr geringe Resistenzhöhung des Deletionsstammes R6 $\Delta$ *dexS* im Vergleich zum Referenzstamm R6 gezeigt werden. Die EOP erreichte jedoch nicht die Werte der Stämme R6-*dexS*::IS10-R\_A bzw. R6-*dexS*::IS10-R\_B.

Parallel dazu wurde das Gen *dexS* mit flankierenden Bereichen der Mutante aR6 sequenziert. Es lag keine Sequenzabweichung im Vergleich zur *S. pneumoniae* R6 Sequenz vor (GenBank Accession: AE007317). Dadurch wurde belegt, dass das Gen *dexS* der Mutante aR6 nicht an einer Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt ist.

In Kapitel 3.2.2.1 fielen die R6-*rpsI*::IS10-R-Transformanten durch ein verlangsamtes Wachstum auf D-Blutagarplatten und durch veränderte Koloniemorphologie im Vergleich zu Transformanten, die mit genomischer DNA der Mutante aR6 transformiert worden waren, auf. Im Gegensatz zu den R6-*rpsI*::IS10-R-Transformanten unterschieden sich die Transformanten, die mit den Fosmiden M-C8 bzw. S-E11 und mit den entsprechenden PCR-Produkten transformiert worden waren, hinsichtlich ihrer Koloniemorphologie bzw. ihres Wachstums nicht von den Transformanten, die mit DNA der Mutante aR6 transformiert worden waren.

Um zu überprüfen, ob sich die Generationszeiten der Transformanten R6-*dexS*::IS10-R\_A und R6-*dexS*::IS10-R\_B von der des Referenzstammes R6 und der Mutante aR6 unterschied, wurde das Wachstumsverhalten in C-Medium untersucht. Das Wachstum der verglichenen Stämme unterschied sich nur geringfügig (Abb. 3. 26). Die Generationszeiten betragen für den Referenzstamm R6 31 min, für die Stämme R6-*dexS*::IS10-R\_A und R6-*dexS*::IS10-R\_B jeweils 32 min, und für die Mutante aR6 38 min. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Resistenz gegen Vancoresmycin nicht durch verminderte Generationszeiten bedingt wird wie es vermutlich bei dem Stamm R6-*rpsI*::IS10-R der Fall ist (vgl. Kapitel. 3.2.2.1 und Abb. 3. 21).



**Abb. 3. 26: Wachstumsverhalten der R6-*dexS*:: IS10-R-Integrianten in C-Medium**

Verglichen wurden das Wachstumsverhalten der Stämme R6 als Referenz (schwarz), aR6 (rot), R6-*dexS*::IS10-R\_A (=R6-IS A, grün) und R6-*dexS*::IS10-R\_B (=R6-IS B, blau) in C-Medium (halblogarithmische Darstellung).

In dem soeben beschriebenen Kapitel wurde das Gen *dexS* detailliert im Hinblick auf seine Rolle in der Resistenz gegen Vancoresmycin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Gen *dexS* der Mutante aR6 nicht um die gesuchte Resistenzdeterminante der Mutante aR6 handelte. Die Transformanten wiesen weder Unterschiede im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten auf D-Blutagarplatten, ihre Koloniemorphologie noch ihr Wachstumsverhalten in C-Medium auf. Durch die ermittelte EOP des Stammes R6 $\Delta$ *dexS* konnte kein Zusammenhang zwischen Deletion und Resistenz gegen Vancoresmycin erschlossen werden. Aufgrund dieser Befunde wurden keine weiteren Analysen im Bezug auf das Gen *dexS* durchgeführt.

### **3.3 Analyse der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit Hilfe von mikroarraybasierten Transkriptomstudien**

Durch die bisher dargestellten Experimente war es nicht möglich, die resistenzvermittelnde Determinante der Mutante aR6 mit Hilfe von Genbanken zu detektieren. Möglicherweise setzt sich die Vancoresmycinresistenz der Mutante aR6 nicht aus einer sondern aus mehreren Resistenzdeterminanten zusammen, die einzeln transformiert, keine ausreichende Resistenz vermitteln. Eine weitere Erklärung besteht darin, dass die gesuchte Resistenzdeterminante der Mutante aR6 in *E. coli* nicht klonierbar gewesen war (siehe 4.2.1).

Um dennoch mögliche Resistenzdeterminanten zu ermitteln, wurde eine neue Strategie überlegt und umgesetzt. Mit Hilfe von Transkriptomanalysen sollte nun untersucht werden, ob sich die resistenzvermittelnden Mutationen auf der Ebene der "Transkriptmengen" widerspiegeln. Dazu wurden jeweils die Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit dem Referenzstamm R6 verglichen. Die Mutanten eR6 und fR6 wurden zusätzlich zu der Mutante aR6 ausgewählt, da sie sich ebenfalls durch eine erhöhte MHK (siehe 3.1.2) auszeichneten, und sich die jeweilige resistenzvermittelnde Determinante bei Transformation des sensitiven R6 mit der entsprechenden genomischen DNA relativ effizient übertragen ließ (siehe 3.1.5). Die Mutante gR6 fiel durch ihr Kettenwachstum auf (siehe 3.1.3).

#### **3.3.1 Auswertung der Transkriptomdaten**

In einer Versuchsreihe wurden die Transkriptome der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit dem des Referenzstammes R6 verglichen (siehe 3.3.1.1 bis 3.3.1.4), wobei die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einem Nephelowert von etwa 80 geerntet worden waren. Die in den Tabellen (Tab. 3. 3, Tab. 3. 4, Tab. 3. 5, Tab. 3. 6) angegebenen Genfunktionen beziehen sich auf die Annotationen von Hoskins *et al.* (2001).

##### **3.3.1.1 Vergleich der Mutante aR6 mit dem Referenzstamm R6**

Das Transkriptom der Mutante aR6 wurde mit dem des Referenzstammes R6 verglichen. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3. 3) sind alle Gene aufgelistet, deren Transkripte mehr als zweifach höher bzw. zweifach niedriger im Vergleich zur Referenz vorlagen. Besonders auffällig war das Gen *copY* (*spr0639*), dessen Transkript mehr als fünffach erhöht vorlag als das des Referenzstammes R6. Das Gen codiert vermutlich für einen Transkriptionsrepressor. Um die Beteiligung dieses Gens an einer Resistenz gegen Vancoresmycin zu überprüfen, wurde es bioinformatisch und experimentell weiter analysiert (siehe 3.3.2.1).

Des Weiteren fielen die erhöhten Transkripte der einzelnen Gene (*spr1764-spr1773*) eines Cytolysinoperons ('Cyl-Operon') in der Mutante aR6 auf. Das Gen *spr1774*, das vermutlich auch Teil des Cyl-Operons ist, fiel nicht auf. Das Cyl-Operon wird in Kapitel 3.3.2.2 weiter behandelt, um eine Beteiligung an der Resistenz gegen Vancoresmycin ab zu wägen.

**Tab. 3. 3: Transkriptomanalyse der Mutante aR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6**

Gene, deren Transkripte in der Mutante aR6 höher vorlagen als im Referenzstamm R6, sind grau unterlegt. Gene, deren Transkripte niedriger als im Referenzstamm vorlagen, sind nicht markiert. Gene, deren Transkripte um mehr als das Dreifache erhöht bzw. erniedrigt waren, sind fett hervorgehoben.

Gennummer	Genname	Mögliche Funktion des Genproduktes	Ratio
<i>spr0047</i>	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase	0,44
<i>spr0051</i>	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	0,45
<i>spr0081</i>	ABC-MSP	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport	2,47
<i>spr0446</i>	<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme EcoKI specificity protein (S protein)	2,64
<i>spr0447</i>	<i>xerD</i>	Integrase/recombinase	0,41
<b><i>spr0448</i></b>	<b><i>hsdS</i></b>	<b>Type I site-specific deoxyribonuclease chain S</b>	<b>0,29</b>
<i>spr0465</i>	<i>blpC</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type	2,88
<b><i>spr0466</i></b>	<b><i>blpB</i></b>	<b>transport protein</b>	<b>3,18</b>
<b><i>spr0467</i></b>	<b><i>blpB</i></b>	<b>transport protein</b>	<b>3,61</b>
<b><i>spr0468</i></b>	<b><i>blpA</i></b>	<b>transport ATP-binding protein</b>	<b>3,70</b>
<i>spr0469</i>	<i>blpA</i>	transport ATP-binding protein	2,82
<i>spr0517</i>	<i>cysE</i>	Serine acetyltransferase	2,00
<b><i>spr0639</i></b>	<b><i>copY</i></b>	<b>COPAB ATPases metal-fist type repressor</b>	<b>5,24</b>
<i>spr1161</i>	ABC-NBD	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	2,34
<i>spr1320</i>		Conserved hypothetical protein	0,47
<i>spr1547</i>		Hypothetical protein	0,48
<b><i>spr1548</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>0,30</b>
<b><i>spr1549</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>0,31</b>
<b><i>spr1764</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>6,67</b>
<b><i>spr1765</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>4,15</b>
<b><i>spr1766</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>7,11</b>
<b><i>spr1767</i></b>	<b><i>cyIM</i></b>	<b>CyIM protein, cytolytic toxin system</b>	<b>3,47</b>
<b><i>spr1768</i></b>		<b>Conserved hypothetical protein</b>	<b>3,94</b>
<b><i>spr1769</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>3,50</b>
<b><i>spr1770</i></b>	<b><i>cyIB</i></b>	<b>ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning</b>	<b>4,73</b>
<i>spr1771</i>	<i>nisP</i>	Subtilisin-like serine protease	1,96
<i>spr1772</i>		Hypothetical protein, truncation	2,95
<b><i>spr1773</i></b>	<b>ABC-NBD</b>	<b>ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate</b>	<b>3,22</b>

Das Gen *spr0448* fiel durch die dreifache Erniedrigung seiner Transkriptmenge auf. Vermutlich ist das Genprodukt Teil eines Restriktionsmodifikationssystems des Typs I. Es



könnte für das Protein HsdS codieren, das mit Hilfe zweier Zielerkennungsdomänen die für das Restriktionsmodifikationssystem spezifische DNA-Sequenz erkennt und bindet (Murray, 2000). Aufgrund seiner Funktion scheint es an der Resistenz gegen Vancoresmycin nicht beteiligt zu sein, weshalb es nicht weiter untersucht wurde.

Darüber hinaus waren die erhöhten Transkriptmengen der Gene *spr0465*, *spr0466*, *spr0467*, *spr0468* und *spr0469* in der Mutante aR6 auffallend. Diese Gene sind Teil eines Regulons, das unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems TCS13 steht. Dieses Regulon wurde in *S. pneumoniae* von de Saizieu *et al.* (2000) analysiert. Das Gen *spr0465* (*blpC*) codiert für ein Peptid, das ein charakteristisches Doppelglycinmotiv enthält und dem ComC ähnlich ist. Die Gene *spr0466*, *spr0467*, *spr0468* und *spr0469* codieren für die Untereinheiten eines ABC-Transporters, der dem ABC-Transporter ComAB homolog ist. Die hier beschriebenen Genfunktionen der Genprodukte lassen nicht auf eine Resistenzbeteiligung schließen, weshalb keine weiteren Experimente mehr mit den genannten Genen bzw. ihrer Genprodukte durchgeführt wurden.

Die Transkripte der Gene *spr1547*, *spr1548* und *spr1549* der Mutante aR6 waren im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptmengen des Referenzstammes R6 erniedrigt. Den entsprechenden Genprodukten konnte keine Funktion zugeordnet werden, da keine Homologien zu anderen Proteinen bestanden. Aufgrund dessen wurden diese Gene und deren Genprodukte nicht weiter charakterisiert.

### **3.3.1.2 Vergleich der Mutante eR6 mit dem Referenzstamm R6**

Durch den Transkriptomvergleich der Mutante eR6 mit dem Referenzstamm R6 fielen zum einen das Gen *copY* (*spr0639*), das vermutlich für einen Transkriptionsrepressor codiert, und zum anderen die meisten Gene des Cyl-Operons (*spr1765-spr1773*) durch erhöhte Transkriptmengen auf (Tab. 3. 4). Die erhöhten Transkriptmengen des Genes *copY* und der Gene des Cyl-Operons sind bereits in der Transkriptomstudie der Mutante aR6 aufgefallen (siehe 3.3.1.1). Auf diese Beobachtungen wird in den Kapiteln 3.3.2.1 bzw. 3.3.2.2 weiter eingegangen.

Die Transkriptmenge des Genes *spr0448* war etwa dreifach erniedrigt verglichen mit der des Referenzstammes R6. Auch in der Transkriptomanalyse der Mutante aR6 wurde diese Tatsache beobachtet. Die Funktion des *spr0448*-Genproduktes wurde bereits in Kapitel 3.3.1.1 erläutert. Dieses Gen wurde nicht weiter untersucht, da eine Beteiligung des Genproduktes an der Resistenz gegen Vancoresmycin unwahrscheinlich erschien.

**Tab. 3. 4: Transkriptomanalyse der Mutante eR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6**

Gene, deren Transkripte in der Mutante eR6 höher vorlagen als im Referenzstamm R6, sind grau unterlegt. Gene, deren Transkripte niedriger vorlagen, sind nicht markiert. Gene, deren Transkriptmengen um mehr als das Dreifache erhöht bzw. erniedrigt waren, sind fett hervorgehoben.

Gennummer	Genname	mögliche Funktion des Genproduktes	Ratio
<i>spr0020</i>		Hypothetical protein	0,44
<b><i>spr0030</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>0,32</b>
<b><i>spr0031</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>0,33</b>
<i>spr0181</i>	<i>orf47</i>	<i>orf47</i>	0,43
<i>spr0276</i>	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	2,88
<i>spr0277</i>		Conserved hypothetical protein	2,27
<i>spr0388</i>		Hypothetical protein	0,36
<i>spr0389</i>		Hypothetical protein	0,42
<b><i>spr0446</i></b>	<b><i>hsdS</i></b>	<b>Type I restriction enzyme EcoKI specificity protein (S protein)</b>	<b>3,76</b>
<i>spr0448</i>	<i>hsdS</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease chain S	0,35
<i>spr0461</i>	<i>blpT</i>	Hypothetical protein	0,45
<b><i>spr0639</i></b>	<b><i>copY</i></b>	<b>COPAB ATPases metal-fist type repressor</b>	<b>3,15</b>
<i>spr0690</i>		Conserved hypothetical protein	0,44
<i>spr0856</i>	<i>celA</i>	Competence protein	0,46
<i>spr0857</i>	<i>celB</i>	Competence protein	0,45
<i>spr0860</i>		Hypothetical protein	0,45
<b><i>spr0881</i></b>	<b><i>coiA</i></b>	<b>Competence protein</b>	<b>0,32</b>
<i>spr1540</i>	<i>alr</i>	Alanine racemase	0,43
<b><i>spr1628</i></b>	<b><i>pilD</i></b>	<b>Type 4 prepilin peptidase</b>	<b>0,26</b>
<i>spr1670</i>	<i>adhB</i>	Alcohol dehydrogenase	2,09
<i>spr1724</i>	<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein	0,43
<i>spr1756</i>	<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein	0,46
<b><i>spr1758</i></b>	<b><i>cinA</i></b>	<b>Competence induced protein</b>	<b>0,29</b>
<i>spr1765</i>		Hypothetical protein	2,18
<b><i>spr1766</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>7,50</b>
<b><i>spr1767</i></b>	<b><i>cyIM</i></b>	<b>CyIM protein, cytolytic toxin system</b>	<b>4,49</b>
<b><i>spr1768</i></b>		<b>Conserved hypothetical protein</b>	<b>6,32</b>
<b><i>spr1769</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>5,24</b>
<b><i>spr1770</i></b>	<b><i>cyIB</i></b>	<b>ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning hemolysin secretion protein</b>	<b>7,17</b>
<i>spr1771</i>	<i>nisP</i>	Subtilisin-like serine protease	2,26
<i>spr1772</i>		Hypothetical protein, truncation	2,97
<b><i>spr1773</i></b>	<b>ABC-NBD</b>	<b>ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate</b>	<b>3,94</b>
<i>spr1829</i>	<i>nadC</i>	Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	0,47
<i>spr1858</i>		Hypothetical protein	0,45
<b><i>spr1859</i></b>		<b>Conserved hypothetical protein</b>	<b>0,28</b>
<i>spr1861</i>	<i>cglD</i>	Competence protein	0,48
<b><i>spr1863</i></b>	<b><i>cglB</i></b>	<b>Competence protein</b>	<b>0,24</b>
<b><i>spr1864</i></b>	<b><i>cglA</i></b>	<b>Competence protein</b>	<b>0,24</b>

Gennummer	Genname	mögliche Funktion des Genproduktes	Ratio
<i>spr2006</i>	<i>cbpD</i>	Choline binding protein D	0,44
<b><i>spr2012</i></b>	<b><i>comFC</i></b>	<b>Involved in transformation (competence for DNA uptake)</b>	<b>0,33</b>

Die Transkriptmengen der Gene *coiA*, *cinA*, *spr1859*, *cgIB*, *cgIA* und *comFC* waren im Vergleich zu den entsprechenden Transkripten des Referenzstammes R6 ca. dreifach, die Transkriptmengen der Gene *celA*, *celB*, *ssbB*, *dinF* und *cgID* etwa zweifach erniedrigt. Bei den aufgeführten Genen handelt es sich um einige der sogenannten späten Kompetenzgene (siehe 1.1.3), die in Abhängigkeit des alternativen Sigmafaktors ComX exprimiert werden (Desai & Morrison, 2006; Campbell *et al.*, 1998, Peterson *et al.*, 2004). Dieser wiederum wird in Abhängigkeit des *comAB*- und *comCDE*-Systems exprimiert. Auf diese Gene wurde nicht weiter eingegangen, da diese vermutlich nicht in eine Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sind.

### 3.3.1.3 Vergleich der Mutante fR6 mit dem Referenzstamm R6

Im folgenden Experiment wurde das Transkriptom der Mutante fR6 mit dem des Referenzstammes R6 verglichen (Tab. 3. 5). Wie es bereits in den Transkriptomanalysen der Mutanten aR6 und eR6 beobachtet wurde, fielen besonders die erhöhten Transkripte der Gene des Cyl-Operons (*spr1765-spr1779*, *spr1772-spr1773*) und des Genes *copY* (*spr0639*) auf. Diese werden in Kapitel 3.3.2.1 bzw. 3.3.2.2 genauer analysiert. Die übrigen Gene wurden nicht genauer charakterisiert.

**Tab. 3. 5: Transkriptomanalyse der Mutante fR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6**

Gene, deren Transkripte in der Mutante fR6 höher vorlagen als im Referenzstamm R6, sind grau hinterlegt. Gene, deren Transkripte in der Mutante fR6 niedriger vorlagen, sind nicht markiert. Gene, deren Transkriptmengen um mehr als das Dreifache erhöht waren, sind fett hervorgehoben.

Gennummer	Genname	mögliche Funktion des Genproduktes	Ratio
<i>spr0446</i>	<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme EcoKI specificity protein (S protein)	2,62
<i>spr0448</i>	<i>hsdS</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease chain S	0,41
<b><i>spr0639</i></b>	<b><i>copY</i></b>	<b>COPAB ATPases metal-fist type repressor</b>	<b>3,99</b>
<i>spr1548</i>		Hypothetical protein	0,43
<i>spr1549</i>		Hypothetical protein	0,47
<b><i>spr1765</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>4,08</b>
<b><i>spr1766</i></b>		<b>Hypothetical protein</b>	<b>8,40</b>
<i>spr1767</i>	<i>cyIM</i>	CyIM protein, cytolytic toxin system	5,87
<b><i>spr1768</i></b>		<b>Conserved hypothetical protein</b>	<b>3,38</b>
<b><i>spr1770</i></b>	<b><i>cyIB</i></b>	<b>ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein</b>	<b>5,46</b>
<i>spr1772</i>		Hypothetical protein, truncation	2,30
<b><i>spr1773</i></b>	<b>ABC-NBD</b>	<b>ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate</b>	<b>3,30</b>

### 3.3.1.4 Vergleich der Mutante gR6 mit dem Referenzstamm R6

Aufgrund der Tendenz zur verlängerten Kettenbildung (siehe Abb. 3. 3), wurde das Transkriptom der Mutante gR6 mit dem des Referenzstammes R6 verglichen (Tab. 3. 6). Im Zuge der Datenauswertung fiel auf, dass weder die Transkriptmengen der Gene des Cyl-Operons noch die des Genes *copY* erhöht waren. Besonders die nahezu neunfach erhöhte Transkriptmenge des Genes *spr0812* in der Mutante gR6 stach hervor. Dieses Gen könnte für ein ATP-Bindeprotein codieren, das vermutlich Teil eines ABC-Transporters ist. Die Transkriptmenge des nachfolgenden Genes *spr0813*, das vermutlich für eine Permeaseuntereinheit eines ABC-Transporters codiert, war in der Mutante gR6 zweifach erhöht. Beide Gene werden im Kapitel 3.3.2.3 detailliert analysiert, um zu klären, ob es sich um potentielle Resistenzdeterminanten handeln könnte.

**Tab. 3. 6: Transkriptomanalyse der Mutante gR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6**

Gene, deren Transkripte in der Mutante gR6 höher vorlagen als im Referenzstamm R6, sind grau unterlegt. Gene, deren Transkripte in der Mutante gR6 erniedrigt vorlagen, sind nicht markiert. Gene, deren Transkripte um mehr als das Dreifache erhöht waren, sind fett hervorgehoben.

Gennummer	Genname	mögliche Funktion des Genproduktes	Ratio
<i>spr0446</i>	<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme EcoKI specificity protein (S protein)	0,43
<i>spr0772</i>		Conserved hypothetical protein	2,47
<b><i>spr0812</i></b>	<b>ABC-NBD</b>	<b>ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate</b>	<b>8,90</b>
<i>spr0813</i>	ABC-MSD	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate	2,08
<i>spr1029</i>	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme	2,05
<i>spr1286</i>		Type II restriction endonuclease, uncharacterized, truncation	0,48

Die Transkriptmenge des Genes *spr0772* war 2,47fach erhöht. Für das Genprodukt konnte eine konservierte Domäne, SufB (COG0719), identifiziert werden. Das Protein SufB wird z. B. in *E. coli* von dem Gen *sufB* codiert, das Teil des Operons *sufABCDE* ist (Takahashi & Tokumoto, 2002). Das Operon *sufABCDE* codiert für diverse Proteine, die an der Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind. So handelt es sich bei SufC um eine lösliche ATPase, die im Cytoplasma zusammen mit SufBD an der Assemblierung und / oder Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt ist (Takahashi & Tokumoto, 2002; Nachin *et al.*, 2003). Außerdem stimulieren der SufBCD-Komplex und SufE synergistisch die Cystein-Desulfurase Aktivität von SufS (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). Es wurde vermutet, dass das SUF-System nur unter bestimmten Bedingungen wie z. B. oxidativen Stress und Eisenmangel genutzt wird (Outten *et al.*, 2004). Da kein unmittelbarer Zusammenhang des Genproduktes mit der Resistenz gegen Vancoresmycin hergestellt werden konnte, wurde dieses Gen nicht weiter analysiert.

Die Transkriptmenge von *spr1029* (*glgB*) war 2,05fach in der Mutante gR6 erhöht. Das Gen *spr1029* codiert für ein 1,4- $\alpha$ -Glucanverzweigungsenzym ('branching enzyme'), das in die Glykogenbiosynthese involviert ist. Da eine Beteiligung des Genproduktes an der Resistenz gegen Vancoresmycin nicht angenommen wurde, wurde dieses Gen nicht weiter untersucht.

### **3.3.2 Analyse der im Transkriptomvergleich der Mutanten aR6, eR6, fR6 und gR6 mit dem Referenzstamm R6 aufgefallenen Gene**

Mit Hilfe der Transkriptomstudien konnte festgestellt werden, dass die Transkriptomte der Mutanten aR6, eR6 und fR6 in einigen Transkripten übereinstimmten. Die Transkriptmenge des Genes *copY* (*spr0639*) war in allen drei Mutanten drei- bis fünffach höher als die entsprechende Transkriptmenge im Referenzstamm R6. Ebenso waren die Transkriptmengen der meisten Gene eines Cyl-Operons (*spr1764* - *spr1773*) in allen drei Mutanten höher als im Referenzstamm R6. Die Mutante gR6 unterschied sich durch ihr Transkriptommuster von den Mutanten aR6, eR6 und fR6. Am auffälligsten war das Gen *spr0812*, dessen Transkript achtfach höher vorlag als das entsprechende Transkript des Referenzstammes R6. Die hier genannten Gene wurden zum einen bioinformatisch charakterisiert und zum anderen deletiert, um zu überprüfen, ob diese Gene in die Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sein könnten.

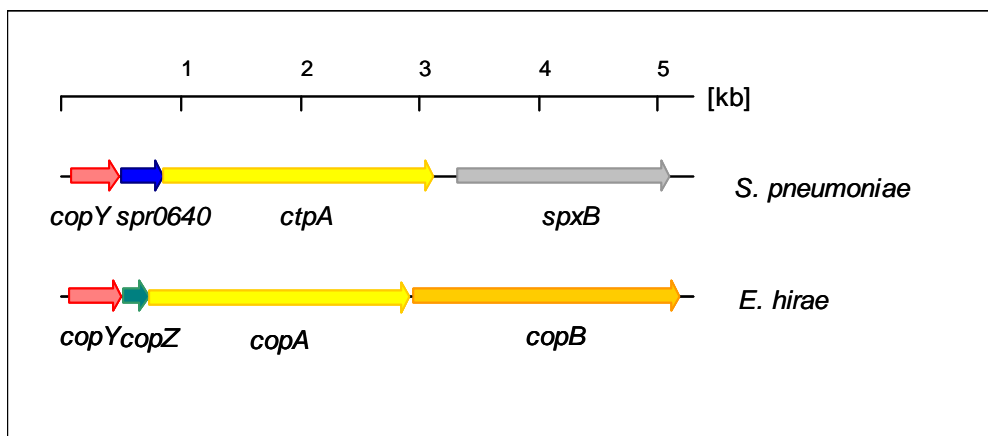
#### **3.3.2.1 Analyse des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6**

Das Gen *copY* (*spr0639*) hat eine Größe von 396 bp und codiert für einen 139 AS langen Transkriptionsrepressor. *copY* bildet das erste Gen eines potentiellen Operons ('*cop*-Operon'), das sich aus den Genen *copY* (*spr0639*), *spr0640* und *ctpA* (*spr0641*) zusammensetzt (Abb. 3. 27). Die Genprodukte dieses *cop*-Operons sind vermutlich an der Regulation der intrazellulären Kupferkonzentration beteiligt, da Homologien zu Genprodukten eines *cop*-Operons in *Enterococcus hirae*, das gut charakterisiert ist, bestehen (Odermatt & Solioz, 1995; Strausak & Solioz, 1997; Cobine *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2006)).

Die Funktion des Operons in *Enterococcus hirae* besteht darin, die intrazelluläre Kupferkonzentration zu regulieren. Die Expression der Gene steht unter regulatorischer Kontrolle des Transkriptionsrepressors CopY. Sobald die Kupferkonzentration im Medium zunimmt, löst sich der Repressor von seinen DNA-Bindestellen (siehe unten) und die Gene werden transkribiert (Odermatt & Solioz, 1995; Strausak & Solioz, 1997).

Allerdings unterscheidet sich die genetische Organisation des Operons in *Enterococcus hirae* von der in *S. pneumoniae* (Abb. 3. 27). In *Enterococcus hirae* befindet sich downstream des Genes *copY* das Gen *copZ*, das für das Chaperon CopZ (69 AS) codiert. In *S pneumoniae* folgt auf das Gen *copY* das Gen *spr0640*, das für ein nicht näher

charakterisiertes Genprodukt codiert. In *E. hirae* codieren die Gene *copA* und *copB* für zwei P-Typ ATPasen, im Gegensatz zu *S. pneumoniae*, das nur ein Gen besitzt (*ctpA*), das vermutlich für eine P-Typ ATPase codiert. Der Transkriptionsrepressor CopY (131 AS) von *S. pneumoniae* besitzt 33% Identität (bezogen auf 131 verglichene AS) zu dem entsprechenden Protein CopY (145 AS) in *E. hirae*. Für die P-typ ATPase CtpA (750 AS) besteht im Vergleich zu dem Protein CopA eine Identität von 44% (bezogen auf 627 verglichene AS). Das nachfolgende Gen *spxB* codiert für eine Pyruvatoxidase und ist wahrscheinlich kein Teil des *cop*-Operons.



**Abb. 3. 27: Vergleich der genetischen Organisation der *cop*-Operons in *S. pneumoniae* und *E. hirae***

Gleiche Farben weisen auf homologe Gene hin (Genbanknummer: *S. pneumoniae*: CopY: AAK99443.1, Spr0640: AAK99444.1, CtpA: AAK99445.1; SpxB: AAK99446.1; *E. hirae*: CopY: CAA86835.1, CopZ: CAA86836.1, CopA: AAA61835.1, CopB: AAA61836.1)

Die ursprüngliche Annotation des Genes *copY* wurde nicht übernommen (Hoskins *et al.*, 2001), da keine geeignete Ribosomenbindestelle vorhanden war. Das erste Translationscodon wurde 31 Basenpaare downstream des ursprünglichen Translationsinitiationscodons festgelegt, da hier eine geeignete Ribosomenbindestelle vorhanden war (Abb. 3. 28). Außerdem wurde ein möglicher Promotor identifiziert (Abb. 3. 28).

```

1  aaatattatt tctataattg acaaatgtag attttaagag tataactgatg agtgtaattg acaaatgtag
      -35 -10 copY annotiert
71  atttggagg tatggtaatg cagatttcag atgcagaatg
      RBS copY neu
      m q i s d a e

```

**Abb. 3. 28: Ausschnitt der stromaufwärts liegenden DNA-Sequenz des Genes *copY***

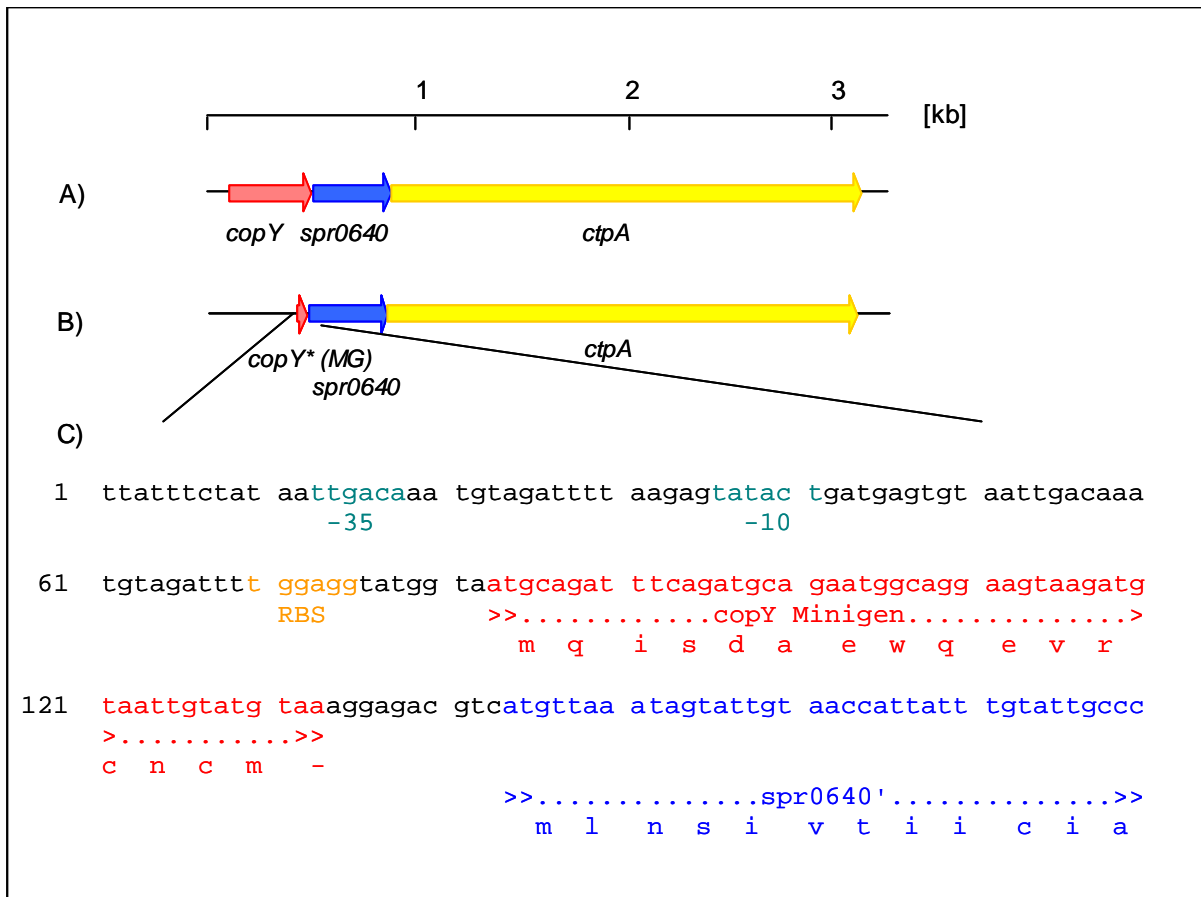
In diesem DNA-Ausschnitt ist die ursprüngliche Annotation (blau) und die neu festgelegte Annotation (rot) des Genes *copY* dargestellt. Ein möglicher Promotor (grün) und eine zum neu festgelegten Translationsstart mögliche Ribosomenbindestelle (orange) sind ebenfalls gekennzeichnet. Potentielle Bindestellen für den Transkriptionsrepressor CopY sind grau hinterlegt.

In einer Publikation von Reyes *et al.* (2006) wurden dem *E. hirae* ähnliche *cop*-Operons in der Ordnung *Lactobacillales* bioinformatisch analysiert. In dieser Untersuchung wurden u. a. Bindestellen der entsprechenden Transkriptionsrepressoren mit Hilfe des Konsensusmotifs **T A G A X X T G T A**, das in *Enterococcus hirae* experimentell bestätigt wurde (Portmann *et al.*, 2004; X entspricht einem beliebigen Nukleotid), identifiziert. Die Bindestelle wurde zweimal im Promotorbereich von *E. hirae* identifiziert (Portmann *et al.*, 2004) sowie auch im Promotorbereich von *copY* in *S. pneumoniae* (Abb. 3. 28; Reyes *et al.*, 2006).

**3.3.2.1.1 Austausch des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit Hilfe der Janusresistenzkassette und Bestimmung der EOP für Vancoresmycin**

Da die Transkripte des Genes *copY* in den Mutanten aR, eR6 und fR6 verglichen mit dem entsprechenden Transkript im Referenzstamm R6 erhöht vorlagen, sollte untersucht werden, ob eine Deletion des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 zu einer Resistenzerniedrigung gegen Vancoresmycin führt. Falls die Resistenz der Mutanten aR6, eR6 und fR6 durch die erhöhten Transkriptmengen des Genes *copY* verursacht worden war, so sollte nach Deletion des Genes *copY* eine Resistenzerniedrigung gegen Vancoresymcin im Vergleich zu den Mutanten aR6, eR6 und fR6 auftreten, da die erhöhten Transkripte nicht mehr vorliegen.

Dazu wurde die Deletion in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit Hilfe der Janusresistenzkassette durchgeführt (Konstruktion der Stämme siehe Kap. 2.9). Dabei wurde das Gen *copY* durch ein *copY\** Minigen in frame ersetzt (Abb. 3. 29). Das aus dem Minigen resultierende Genprodukt CopY\* setzt sich aus den ersten neun N-terminalen AS und den letzten sieben C-terminalen AS des ursprünglichen Genproduktes CopY zusammen.



**Abb. 3. 29: Austausch des Genes *copY* durch das *copY\** Minigen**

A) Genetische Organisation des *cop*-Operons in *S. pneumoniae* R6

B) Genetische Organisation des *cop*-Operons nach Konstruktion der Stämme aR6Δ*copY*, eR6Δ*copY* und fR6Δ*copY* (MG= Minigen)

C) DNA-Sequenz des Minigens *copY\** und der Umgebung (möglicher Promotor: grün; RBS: orange) mit abgeleiteter AS-Sequenz der Genprodukte CopY\* und Spr0640'

In einem Experiment wurde das Wachstum der Deletionsstämme aR6Δ*copY*, eR6Δ*copY* und fR6Δ*copY* im Vergleich zu den Stämmen R6 (Negativkontrolle), aR6, eR6 und fR6 auf D-Blutagarplatten mit Vancoresmycinkonzentrationen von 0,55 µg/ml und 0,65 µg/ml verglichen. Dazu wurden die Stämme bis Nephelo N = 30 wachsen gelassen und 1:200 verdünnt. Anschließend wurde ein Volumen von 25 µl auf die entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum der Deletionsstämme wurde im Vergleich zu den entsprechenden Mutanten nicht inhibiert. Das Wachstum der Negativkontrolle R6 war auf beiden Konzentrationen vollständig gehemmt. Da für die Stämme aR6Δ*copY*, eR6Δ*copY* und fR6Δ*copY* keine Wachstumshemmung im Vergleich zu den Mutanten aR6, eR6 und fR6 bei Konzentrationen von 0,55 µg/ml und 0,65 µg/ml Vancoresmycin festgestellt wurde, wurde davon ausgegangen, dass der Transkriptionsrepressor CopY nicht direkt an einer Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt ist.



Zur Bestätigung wurde stellvertretend für alle Deletionsstämme eine EOP-Bestimmung des Stammes aR6 $\Delta$ copY im Vergleich zu der Mutante aR6 und dem Referenzstamm R6 für Vancoresmycin durchgeführt. Auf einer Konzentration von 0,55  $\mu$ g/ml Vancoresmycin wurde eine EOP von 67,7% für den Stamm aR6 $\Delta$ copY im Vergleich zu 54,1% für die Mutante aR6 bestimmt. Das Wachstum des Referenzstammes war vollständig inhibiert. Damit war gezeigt worden, dass eine Deletion von *copY* keine Erniedrigung der EOP für Vancoresmycin verursacht.

### 3.3.2.1.2 Transformation der *cop*-Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 in den sensitiven Rezipienten R6

In einem weiteren Versuch sollte aufgeklärt werden, ob möglicherweise durch Transformation des *cop*-Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 eine Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Rezipienten R6 übertragen werden kann. Mit Hilfe einer long-range-PCR wurde ein 7,5 kb großer Bereich, der das komplette Operon samt flankierender Bereiche umfasste (upstream: 1,1 kb; downstream: 3,3 kb), von genomischer DNA der Mutanten aR6, eR6 und fR6 amplifiziert (Primer: *cop\_up2* und *cop\_down2*). Der sensitive Rezipient R6 wurde mit jeweils 200 ng PCR-Produkt transformiert und auf 0,5  $\mu$ g/ml Vancoresmycin selektioniert. Als Positivkontrolle diente 200 ng genomische DNA der Mutante aR6. Durch Transformation der PCR-Produkte wurden keine Transformanten erhalten. Die Transformationseffizienz bei Transformation mit genomischer aR6-DNA betrug 2,8%. Durch dieses Transformationsexperiment war gezeigt worden, dass die *cop*-Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 keine Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Rezipienten R6 übertragen.

### 3.3.2.1.3 Sequenzierung des Genes *copY* in aR6, eR6 und fR6

In dem vorangegangenen Experiment wurde dargestellt, dass die *cop*-Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 keine Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Rezipienten R6 übertragen. Um zu bestätigen, dass keine Mutation in dem Gen *copY* der Mutanten aR6, eR6 und fR6 vorliegt, wurde das Gen *copY* inklusive des vorhergesagten Promotors in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 jeweils doppelsträngig sequenziert (Primer: *copY\_for* und *copY\_rev*). Im Sequenzvergleich mit *S. pneumoniae* R6 (Genbanknummer: AE007317) konnten keine Abweichungen festgestellt werden.

Da durch Sequenzierung des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 keine Mutation identifiziert wurde und da durch Transformation des sensitiven Stammes R6 mit DNA, die der *cop*-Operons der Mutanten aR6, eR6 und fR6 entsprach, keine Transformanten erhalten wurden, und da bei einer Deletion des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 keine Resistenzerniedrigung gegen Vancoresmycin im

Vergleich zu den Ausgangsstämmen aR6, eR6 und fR6 festgestellt wurde, wurde eine direkte Beteiligung des Genes *copY* an der Resistenz gegen Vancoresmycin ausgeschlossen. Die erhöhte Transkriptmenge des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 ist möglicherweise eine Folge der noch nicht identifizierten Resistenzdeterminanten.

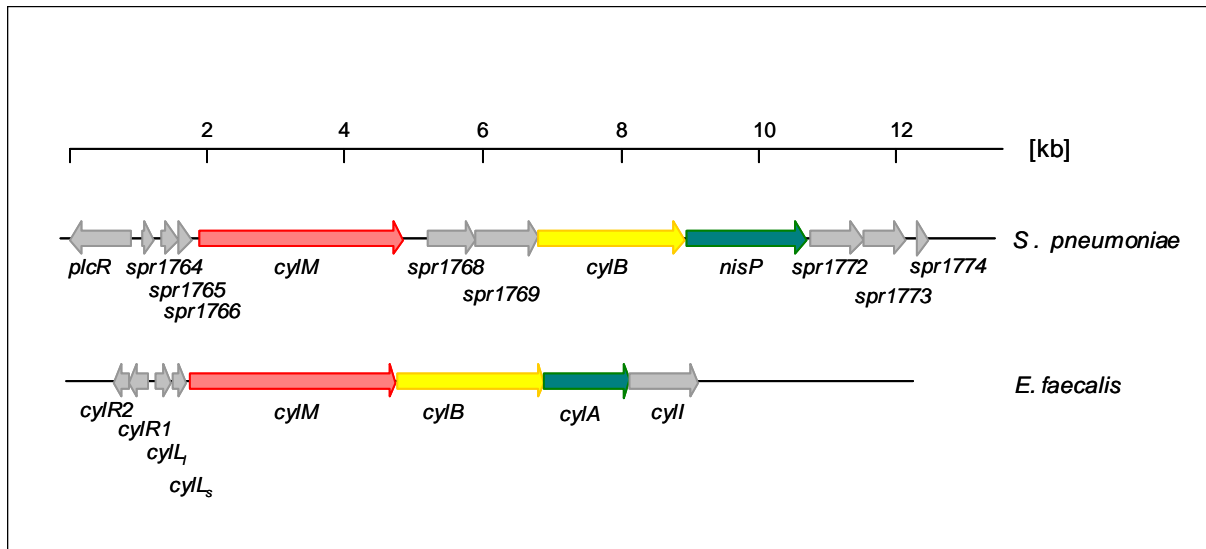
### 3.3.2.2 Analyse des Cyl-Operons in den Mutanten aR6, eR6 und fR6

Während der Transkriptomanalyse der Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit dem Referenzstamm R6 fielen die erhöhten Transkriptmengen der Gene eines Cytolysinoperons ('Cyl-Operon') auf. Im Folgenden werden die Gene dieses Operons näher charakterisiert. Zudem sollte experimentell ermittelt werden, inwiefern das Cyl-Operon an der Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt ist.

#### 3.3.2.2.1 Bioinformatische Analyse des Cyl-Operons

In *S. pneumoniae* R6 setzt sich das Cyl-Operon vermutlich aus insgesamt elf Genen zusammen (*spr1764* - *spr1774*, Abb. 3. 30), das durch das Genprodukt des entgegen gerichteten Genes *plcR* reguliert werden könnte. Die einzelnen Gene sind in der Literatur kaum beschrieben worden. Da für einige Genprodukte Homologien zu einem gut charakterisierten Cyl-Operon aus *Enterococcus faecalis* bestehen (Coburn *et al.*, 1999; Gilmore *et al.*, 1994; Shankar *et al.*, 2004), konnte die Funktion einiger Genprodukte erschlossen werden.

Im Gegensatz zu dem Cyl-Operon in *S. pneumoniae* setzt sich das Cyl-Operon in *E. faecalis* aus sechs Genen zusammen (Abb. 3. 30). Die Genprodukte bilden, modifizieren und sezernieren ein bakterielles Toxin, das mit den Lantibiotika entfernt verwandt ist (Coburn *et al.*, 1999; Gilmore *et al.*, 1994; Shankar *et al.*, 2004). In *Enterococcus faecalis* wird das Cyl-Operon durch die Genprodukte CylR1 und CylR2 reguliert. Dabei wird die Expression durch ein Quorum-Sensing-Mechanismus mit Hilfe des prozessierten Genproduktes CylL<sub>s</sub> aktiviert (Haas *et al.*, 2002).



**Abb. 3. 30: Genetische Organisation des Cyl-Operons in *S. pneumoniae* und in *E. faecalis***

Zueinander homologe Gene sind in der gleichen Farbe dargestellt. Grau markierte Gene besitzen keine Homologien (Genbanknummer: *S. pneumoniae*: NC003098; *E. faecalis*: AF394225, L37110, AF102550).

In Tab. 3. 7 werden identifizierte konservierte Domänen, Blast-Ergebnisse und mögliche Funktionen der Genprodukte, die durch die Gene des Cyl-Operons codiert werden, zusammengefasst: Der Regulator PlcR (287 AS) aus *S. pneumoniae* reguliert vermutlich die Expression der Gene *spr1764* bis *spr1774*. N-terminal konnte ein Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv (AS 7 bis AS 61) identifiziert werden. PlcR zeigt keine Homologien zu CylR1 bzw. CylR2 aus *Enterococcus faecalis*. Allerdings gibt es Homologien zu den beschriebenen Regulatoren PlcR aus *Bacillus cereus* (26% Identität bezogen auf 241 verglichene AS; Okstad *et al.*, 1999) und aus *Bacillus thuringiensis* (26% Identität bezogen auf 238 verglichene AS; Lereclus *et al.*, 1996), die an der Regulation einiger verschiedener Virulenzfaktoren beteiligt sind (Agaisse *et al.*, 1999). Die folgenden drei Gene *spr1764*, *spr1765* und *spr1766* codieren für drei Oligopeptide, die eine Länge von 56 AS, 74 AS und 62 AS aufweisen. Die Funktionen dieser Genprodukte konnte aufgrund fehlender Homologien nicht näher eingeordnet werden. In den Genprodukten, codiert durch *spr1765* und *spr1766*, konnte ein Doppelglycinmotiv identifiziert werden (Konsensussequenz: **L S X X E L X X I X G G**, wobei X einer beliebigen AS entspricht; Håvarstein, *et al.*, 1994; Dirix *et al.*, 2004). Dieses Motiv wird oft in Peptiden grampositiver Bakterien identifiziert, die in Quorum-Sensing-Systemen involviert sind oder bei denen es sich um (vorläufige) Bakteriocine handelt (Håvarstein, *et al.*, 1994; Dirix *et al.*, 2004). Dirix *et al.*, 2004 haben in verschiedenen grampositiven Bakterien nach diesem Doppelglycinmotiv gescreent, wobei sie nach Motiven suchten, die mit den AS GG oder GA endeten. Sie identifizierten dieses Motiv in Spr1765 und Spr1766, wobei das Motiv des Peptides Spr1765 mit den AS G und A endete.

**Tab. 3. 7: Analyse der Genprodukte des Cyl-Operons und des Cyl-Operon regulierenden Transkriptionsaktivator PlcR**

Gen	Länge Genprodukt	konservierte Domäne	Blast Hits <sup>(1)</sup> (blastp)	vorhergesagte Funktion des Genproduktes	Referenz
<i>spr1763</i> ( <i>plcR</i> )	287 AS	Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv (AS 7 bis AS 61); XRE-Familie (cd00093)	PlcR ( <i>B. cereus</i> ): 26% Identität (241 AS); PlcR ( <i>B. thuringiensis</i> ): 26% Identität (238 AS)	Transkriptionsaktivator	Okstad <i>et al.</i> , 1999; Lereclus <i>et al.</i> , 1996
<i>spr1764</i>	56 AS	keine	keine		
<i>spr1765</i>	74 AS	Doppelglycinmotiv (AS 28, AS 29)	keine		Dirix <i>et al.</i> , 2004
<i>spr1766</i>	62 AS	Doppelglycinmotiv (AS 24, AS 25)	keine		Dirix <i>et al.</i> , 2004
<i>spr1767</i> ( <i>cyIM</i> )	996 AS	LcnDR2 (COG4403): Lantibiotika modifizierende Enzyme	CyIM ( <i>E. faecalis</i> ): 24% Identität (1020 AS)	posttranslationale Modifikation	Gilmore <i>et al.</i> , 1994
<i>spr1768</i>	234 AS	WrbA (COG0655)	keine		
<i>spr1769</i>	309 AS	keine	keine		
<i>spr1770</i> ( <i>cyIB</i> )	702 AS	SunT (COG2274): ABC-Exporter für Bacteriocin/Lantibiotika; N-terminal: Doppelglycin-Peptidasedomäne	CyIB ( <i>E. faecalis</i> ): 33% Identität (713 AS)	ABC-Exporter mit Peptidaseaktivität	Gilmore <i>et al.</i> , 1990
<i>spr1771</i> ( <i>nisP</i> )	579 AS	Peptidase_S8 (AS152-483) (pfam0082)	CyIA ( <i>E. faecalis</i> ): 29% Identität (294 AS)	Serinprotease	Segarra <i>et al.</i> , 1991
<i>spr1772</i>	255 AS	uncharakterisierte konservierte Domäne (COG4652); C-Terminus (AS155-254) DUF1430 (pfam07242)	keine	C-Terminus ist möglicherweise in Immunität involviert	
<i>spr1773</i>	210 AS	SalX (COG1136)	keine	ATPase-UE eines antimikrobiellen Peptidtransportsystems	
<i>spr1774</i>	53 AS	keine	keine		

<sup>(1)</sup>: Die in Klammern angegebene Anzahl entspricht der Anzahl der verglichenen AS, auf die sich die angegebene Identität bezieht)

In *E. faecalis* codieren *cyIL<sub>L</sub>* und *cyIL<sub>S</sub>* für die vorläufigen Untereinheiten Cyl<sub>L</sub> und Cyl<sub>S</sub> des späteren aktiven Cytolysins. Die Genprodukte Cyl<sub>L</sub> und Cyl<sub>S</sub> werden ribosomal synthetisiert (68 AS bzw. 63 AS) und anschließend durch das *cyIM*-Genprodukt posttranslational modifiziert (Gilmore *et al.*, 1994). Das *cyIM*-Genprodukt (996 AS) aus *S. pneumoniae* besitzt eine Homologie zu CyIM aus *E. faecalis* (24% Identität, bezogen auf 1020 verglichene AS). Es konnte die konservierte Domäne LcnDR2 identifiziert werden. Vertreter, die diese Domäne ebenfalls aufweisen, modifizieren enzymatisch Lantibiotika. Möglicherweise ist das *cyIM*-Genprodukt an einer Modifikation eines oder mehrerer Oligopeptide, die durch die Gene *spr1765* und *spr1766* codiert werden, beteiligt, da diese Genprodukte ein Doppelglycinmotiv aufweisen.

Die Gene *spr1768* und *spr1769* codieren für zwei nicht näher charakterisierte Proteine (234 AS bzw. 309 AS). Im Cyl-Operon von *E. faecalis* gibt es zwischen den Genen *cyIM* und *cyIB* keine weiteren Gene.

Bei dem *cylB*-Genprodukt von *E. faecalis* handelt es sich um einen ABC-Transporter, der zusätzlich N-terminal eine Proteasedomäne besitzt. Dieser exportiert die durch das *cylM*-Genprodukt modifizierten Cytolysinuntereinheiten, und spaltet dabei eine 24 AS bzw. eine 36 AS Leader-Sequenz ab. Auch das Genprodukt CylB (702 AS) von *S. pneumoniae* könnte für einen ABC-Transporter codieren, da Ähnlichkeiten zu CylB von *E. faecalis* gefunden wurden (33% Identität, bezogen auf 713 verglichene AS). Zudem konnte im N-terminalen Ende eine Doppelglycinpeptidasedomäne identifiziert werden.

Das Gen *nisP* (*spr1771*) codiert für ein 579 AS langes Protein, bei dem es sich vermutlich um eine Serinprotease handelt. Dieses Protein besitzt eine Ähnlichkeit zu dem *cylA*-Genprodukt aus *E. faecalis* (29% Identität, bezogen auf 294 verglichene AS), das sechs AS von den jeweiligen N-Termini der Cytolysin-UE abspaltet, wodurch die Toxinuntereinheiten aktiv werden.

Das Gen *spr1772* codiert für ein Protein (255 AS), das nicht näher eingeordnet werden konnte. Möglicherweise ist es ein Immunprotein. Das Gen *spr1773* codiert vermutlich für ein ATP-Bindeprotein (210 AS), wobei die eigentliche Funktion des Genproduktes nicht abgeleitet werden konnte. In *E. faecalis* wurde kein homologes Genprodukt identifiziert. Das letzte Gen des Cyl-Operons, *spr1774*, codiert für ein kleines Oligopeptid (53 AS), dessen Funktion aufgrund fehlender Homologien nicht erschlossen werden konnte.

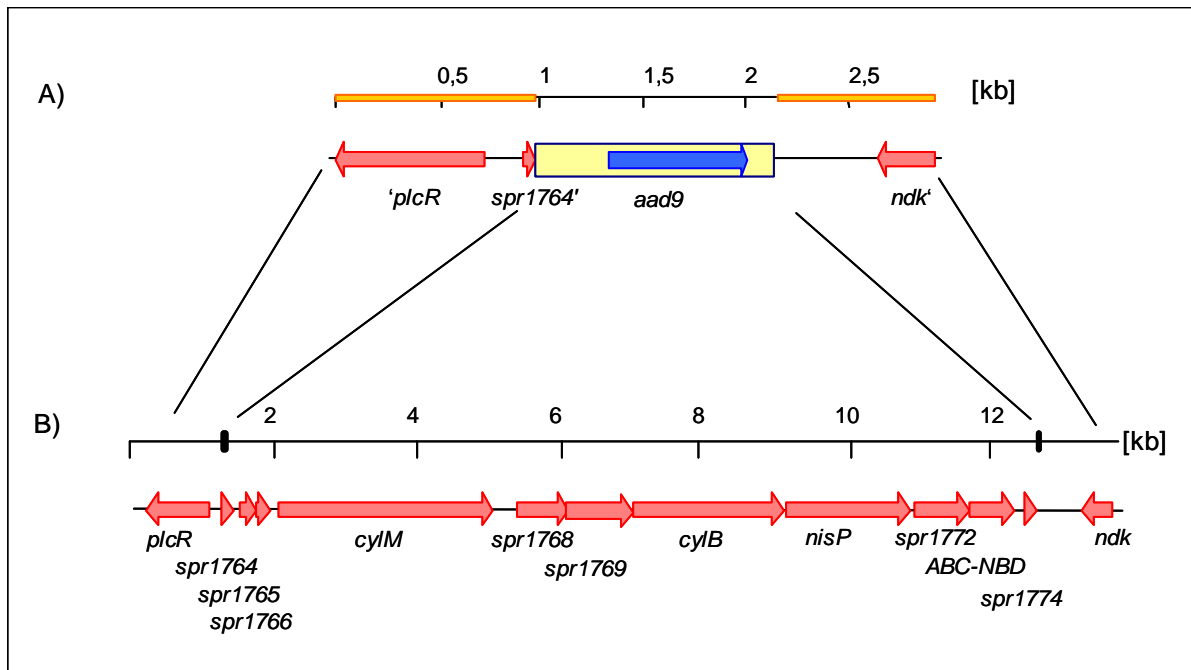
Das Cyl-Operon in *E. faecalis* wird durch das Gen *cylI* abgeschlossen, das für das Immunitätsprotein CylI codiert. Es handelt sich dabei um ein Schutzprotein, das den Cytolysin produzierenden Stamm vor dem aktiven Cytolysin schützt (Coburn *et al.*, 1999).

#### **3.3.2.2.2 Deletion des Cyl-Operons in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 und Bestimmung der EOP für Vancoresmycin**

Wie aus den Transkriptomanalysen der Mutanten aR6, eR6 und fR6 im Vergleich mit dem Referenzstamm R6 hervorging, waren die Transkriptmengen der Gene des Cyl-Operons erhöht (siehe 3.3.1.1, 3.3.1.2, 3.3.1.3). Um eine Beteiligung des Cyl-Operons an der Resistenz gegen Vancoresmycin abzuklären, wurde es in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 durch eine Spectinomycinresistenzkassette ersetzt. Anschließend wurde eine EOP-Bestimmung der Stämme aR6 $\Delta$ cyl, eR6 $\Delta$ cyl und fR6 $\Delta$ cyl für Vancoresmycin im Vergleich zu den Ausgangsstämmen aR6, eR6, fR6 und zur Negativkontrolle R6 durchgeführt. Falls die erhöhten Transkriptmengen der Gene des Cyl-Operons in eine Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sind, dann sollte durch die Deletion eine Resistenzerniedrigung zu beobachten sein, da keine erhöhten Transkriptmengen mehr in der Zelle vorliegen.

Das Cyl-Operon wurde durch Transformation des Plasmides pDEL17 deletiert, in dem die Spectinomycinresistenzkassette mit flankierenden Bereichen des Cyl-Operons in das

Plasmid pUC19 kloniert worden war (Abb. 3. 31). Dieses Konstrukt wurde von Carsten Volz konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Carsten Volz, Dissertation 2008).



**Abb. 3. 31: Austausch des Cyl-Operons durch eine Spectinomycinresistenzkassette**

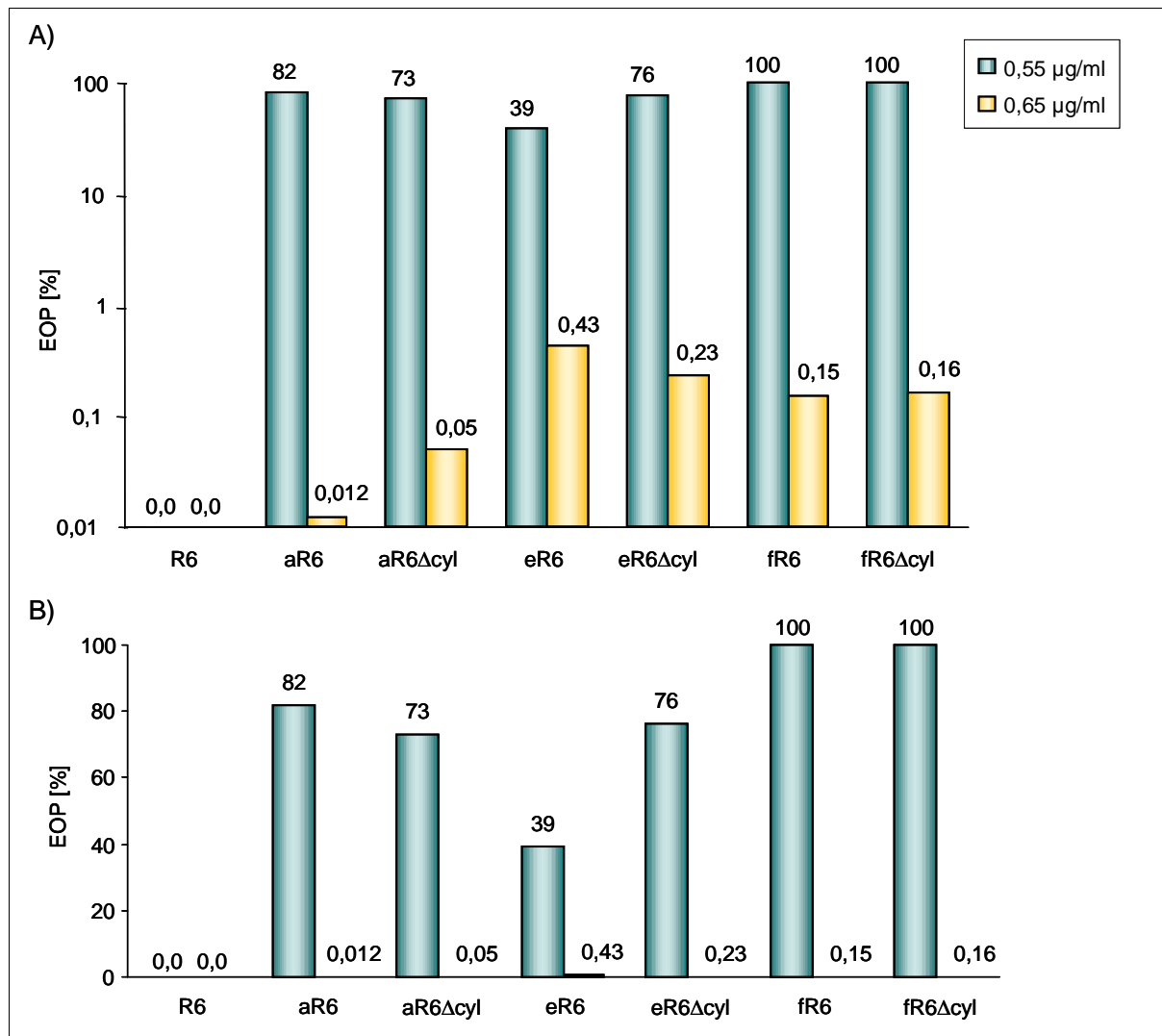
A) Genanordnung des Inserts von Plasmid pDEL17

B) Genetische Organisation des Cyl-Operons in *S. pneumoniae*

Die Gene, die sich innerhalb der beiden schwarzen Balken ( B ) befinden, wurden durch die Spectinomycinresistenzkassette (gelb) ersetzt. Bei den in A) orange markierten Bereichen handelt es sich um die flankierenden Bereiche des Cyl-Operons. Die Spectinomycinresistenz wird durch das *aad9*-Genprodukt vermittelt (*aad9*: blau; LeBlanc *et al.*, 1991).

Nach Transformation der Mutanten aR6, eR6 und fR6 mit dem Plasmid-DNA pDEL17 und Selektion auf 80 µg/ml Spectinomycin, wurden die Transformanten durch eine Kontroll-PCR (Primer: ctrl17\_for und ctrl17\_rev) überprüft. Die Transformanten wurden als Glycerindauerkultur mit der Bezeichnung aR6Δcyl, eR6Δcyl bzw. fR6Δcyl konserviert.

Die Bestimmung der EOP wurde für zwei verschiedene Konzentrationen Vancoresmycin durchgeführt (0,55 µg/ml und 0,65 µg/ml). Die Deletionsstämme aR6Δcyl, eR6Δcyl und fR6Δcyl wurden im Vergleich zu der jeweiligen Mutante betrachtet. Als Negativkontrolle diente der Referenzstamm R6. Wie aus Abb. 3. 32 ersichtlich ist, stimmten die EOP der Deletionsstämme im Vergleich zu den der Mutanten auf der entsprechenden Antibiotikumkonzentration überein. Das Wachstum des Referenzstammes R6 wurde vollständig inhibiert.



**Abb. 3. 32: Bestimmung der EOP der Stämme aR6Δcyl, eR6Δcyl und fR6Δcyl für Vancoresmycin im Vergleich zu den Mutanten aR6, eR6 und fR6 und zum Referenzstamm R6**

Bestimmt wurden die EOP der Stämme aR6Δcyl, eR6Δcyl, fR6Δcyl jeweils im Vergleich zu der entsprechenden Mutante aR6, eR6 und fR6 auf D-Blutagarplatten für Vancoresmycin (grün: 0,55 µg/ml Vancoresmycin; gelb: 0,65 µg/ml Vancoresmycin). Der Referenzstamm R6 diente als Negativkontrolle ( A) halblogarithmische Skalierung; B) normale Skalierung).

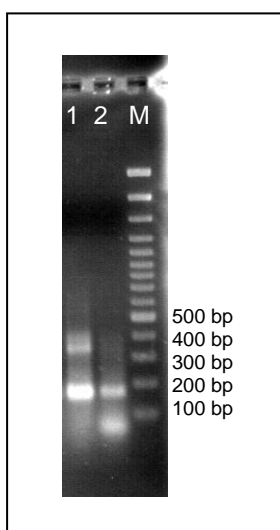
Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass das Cyl-Operon in eine Resistenz gegen Vancoresmycin nicht involviert ist. Falls die Gene des Cyl-Operons an der Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt gewesen wären, wäre eine Resistenzerniedrigung zu erwarten gewesen, da die erhöhten Transkriptmengen durch die Deletion nicht vorhanden waren. Da durch Deletion des Cyl-Operons keine Resistenzerniedrigung festgestellt worden ist, wurde auf das Cyl-Operon nicht weiter eingegangen.

### 3.3.2.3 Analyse des ABC-Transporter-Operons *orf1-abcAB* in der Mutante gR6

Durch die Transkriptomanalyse der Mutante gR6 ist ein ABC-Transporter, codiert durch *spr0812* und *spr0813*, durch erhöhte Transkriptmengen seiner Gene aufgefallen (siehe 3.3.1.4). In der Literatur wurde dieser ABC-Transporter in *S. pneumoniae* nicht beschrieben. Aufgrund dessen wird dieser ABC-Transporter basierend auf Homologievergleichen charakterisiert. Die Gene, die für diesen ABC-Transporter codieren, wurden in dieser Arbeit als *abcAB* (ATP-binding cassette) bezeichnet. Im weiteren Verlauf werden verschiedene Experimente aufgeführt, die zeigen, inwiefern dieser ABC-Transporter an der Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt ist.

Zuerst wurde die genetische Organisation eines möglichen Operons *abcAB* analysiert. Dazu wurde der Transkriptionsstart durch 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) bestimmt und nach einem potentiellen Terminator gesucht.

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde am Ende des Verfahrens eine PCR durchgeführt, um mit Hilfe des amplifizierten Produktes (Primer: *spr0812\_rev6* und RACE-PCR\_5) den Transkriptionsstart +1 durch Sequenzierung (Primer: *spr0812\_rev6*) zu identifizieren (siehe 2.10). Auf dem Agarosegelbild (Abb. 3. 33) befindet sich in Spur 1 die eigentliche Probe und in Spur 2 die Negativkontrolle. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um einen RNA-Ansatz, der nicht mit TAP (tobacco acid pyrophosphatase) behandelt worden ist. Dadurch konnte das RNA-Oligonukleotid nicht an die RNA ligiert werden und infolgedessen sollte kein PCR-Produkt entstehen. Allerdings waren auf dem Agarosegelbild zwei Banden ersichtlich (Spur 2; ca. 180 bp und 80 bp), bei denen es sich vermutlich um Artefakte handelte. Bei einer Größe von etwa 330 bp liefen in Spur 1 zwei Banden. Diese Banden wurden aus einem präparativen Agarosegel eluiert, und in den Vektor pUC19 subkloniert. Verschiedene Inserts wurden sequenziert und der Transkriptionsstart ermittelt.



**Abb. 3. 33: RACE-PCR-Produkt**

(Spur 1: Probe; Spur 2: Negativkontrolle; M=Marker)



An Hand der Sequenzdaten lagen zwei mögliche Transkriptionsstartpunkte vor (Abb. 3. 34). Der in Abb. 3. 34 blau gekennzeichnete Transkriptionsstart wurde nicht als Transkriptionsstart in Erwägung gezogen, da kein Promotor abgeleitet werden konnte (Abb. 3. 33; 'untere' Bande; 296 bp). Der in Abb. 3. 34 rot gekennzeichnete Transkriptionsstartpunkt (Abb. 3. 33; 'obere Bande', 333 bp) wurde im Folgenden als der korrekte Transkriptionsstart angenommen, da sich in einem Basenabstand von 7 bp eine -10-Region und in einem Basenabstand von 31 bp eine -35-Region identifizieren ließen. Sowohl die -10-Region als auch die -35-Region sind nicht hochkonserviert und weisen jeweils zwei Abweichungen von der Konsensussequenz auf. Der Promotor wurde in dieser Arbeit als P<sub>abc</sub> bezeichnet.

```

1  aggttatggc aagcggcttt tttttgatgt aaactagact cataaagaac aaaggagtaa
   -35                -10                +1(1.)

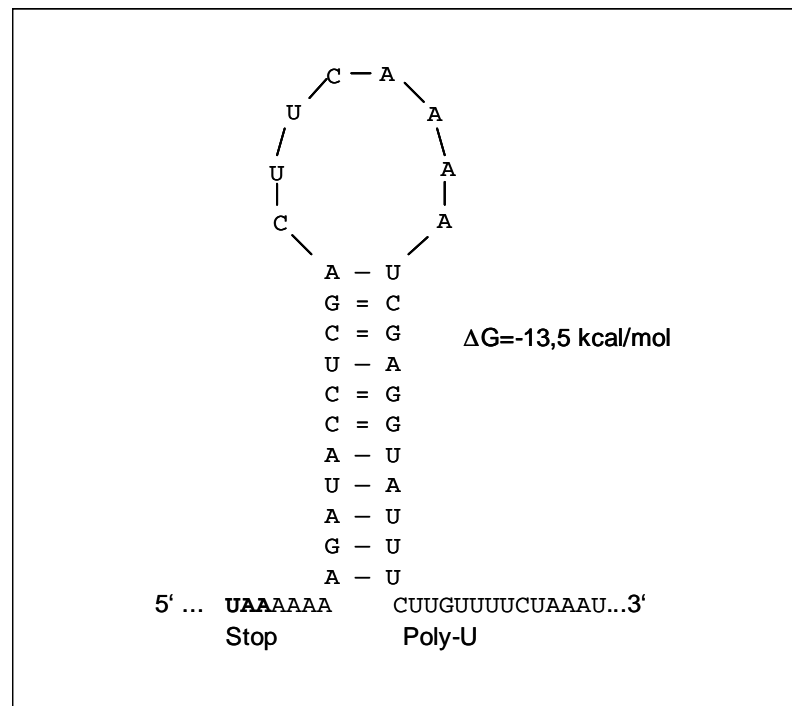
61 catcatgaaa caaatcttac ataagaaaac tagaaaacca agtcacaaaag aaattgagcg
                               +1 (2.)

```

**Abb. 3. 34: DNA-Sequenzausschnitt zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes**

Durch 5'-RACE wurden zwei mögliche Transkriptionsstartpunkte bestimmt (rot bzw. blau gekennzeichnet). Aufgrund eines fehlenden Promotors wurde der blau markierte Transkriptionsstart nicht als der eigentliche Transkriptionsstart angesehen. Vor dem rot markierten Transkriptionsstartpunkt konnte ein Promotor (grün) identifiziert werden.

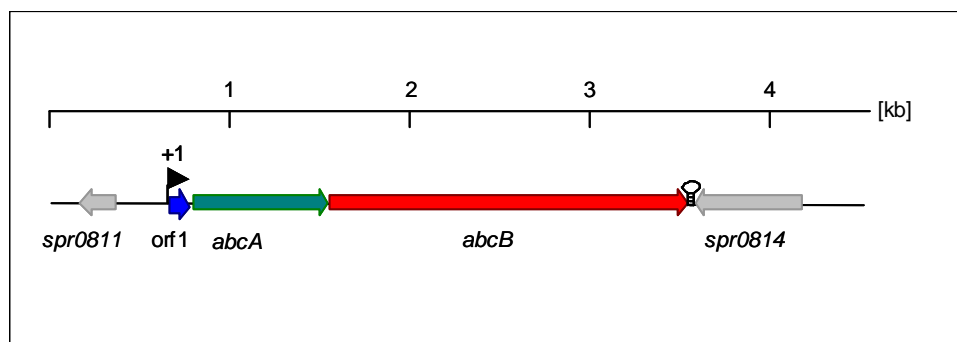
Mögliche Terminatoren der mRNA-Synthese können durch Faltung von RNA identifiziert werden, da die mRNA-Synthese an einer palindromischen Sequenz, gefolgt von einer Poly-U-Sequenz, beendet wird. Dadurch bildet sich eine Sekundärstruktur aus, an der sich die RNA-Polymerase von der DNA löst. Diese Faltung kann mit Hilfe von Computerprogrammen durchgeführt werden, wie beispielsweise mit dem hier verwendeten Programm von Prof. Michael Zuker (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>), das auf thermodynamischen Methoden basiert. So konnte ein möglicher Terminator nach dem Gen *abcB* identifiziert werden (Abb. 3. 35). Stromabwärts des Stopcodons von *abcB* befindet sich in einem Abstand von vier Nukleotiden eine palindromische Sequenz, die einem potentiellen *rho*-unabhängigen Terminator entspricht (Tinoco *et al.*, 1973). Es wurde ein  $\Delta G$ -Wert von -13,5 kcal/mol berechnet.



**Abb. 3. 35: Potentieller Terminator nach dem Gen *abcB***

Dargestellt ist der 3' nicht codierende Bereich von *orf1-abcAB*.

Nachdem der Transkriptionsstart und ein möglicher Terminator identifiziert worden waren, wurde die Sequenz im Hinblick auf ihre offene Leserahmen untersucht. Dabei setzte sich das mögliche Operon aus drei orfs zusammen (Abb. 3. 36).



**Abb. 3. 36: Genetische Organisation des Operons *orf1-abcAB***

*orf1* (blau), *abcA* (grün), das für ein ATP-Bindeprotein codiert, und *abcB* (rot), das für eine Permease-UE codiert, bilden ein Operon. Der Transkriptionsstart (+1) und ein möglicher Terminator sind eingezeichnet.

Der erste orf, der *orf1* genannt wurde, hat eine Länge von 108 bp. Bei dem zweiten orf handelt es sich um das Gen *spr0812* (*abcA*). Die ursprüngliche Annotation des Genes *spr0812* im *S. pneumoniae* R6 Genom (Hoskins *et al.*, 2001) wurde in dieser Arbeit nicht übernommen, da keine geeignete Ribosomenbindestelle identifiziert werden konnte. Der Translationsstart wurde 57 bp stromabwärts zum ursprünglichen Translationsstart neu festgelegt, da hier eine Ribosomenbindestelle vorhanden war (Abb. 3. 37).

```

1  aggttatggc aagcggcttt tttttgatgt aaactagact cataaagaac aaaggagtaa
   -35 -10 +1 RBS
61  catcatgaaa caaatcttac ataagaaaac tagaaaacca agtcacaaaag aaattgagcg
   >>.....orf 1.....>
   m k q i l h k k t r k p s h k e i e
121  cgttcagctg ggatgcacta tgatgcaagc tacatttcat ttgatgggat attaagaaag
   annotiertes ATG
   >.....orf 1.....>>
   r v q l g c t m m q a t f h l m g y -
181  gagattctca tgacaactttt agatgtaaaa
   RBS neuer Start
   >>.....abcA'.....>>
   m t l l d v k

```

**Abb. 3. 37: DNA-Sequenz vor dem Gen *abcA* zur Bestimmung des Translationsstartpunktes**

Das von Hoskins *et al.* (2001) annotierte ATG von *abcA* ist unterstrichen und grau gekennzeichnet. Das neu angenommene ATG ist rot und fett hervorgehoben. Die RBS der Gene *orf1* und *abcA* sind orange markiert, der Promotor grün, der Transkriptionsstart rot.

Das Gen *abcA* hat eine Länge von 759 bp und könnte für ein 252 AS langes Protein codieren. Im Anschluss an das Gen *spr0812* folgt das Gen *spr0813 (abcB)*, das eine Länge von 1989 bp aufweist und für ein 662 AS langes Protein codieren könnte.

Das Operon *orf1-abcAB* wird von den Genen *spr0811* und *spr0814* flankiert, die in jeweils gegenläufiger Richtung liegen (Abb. 3. 36).

Nachdem nun die genetische Organisation des Operons *orf1-abcAB* analysiert worden ist, werden die entsprechenden Genprodukte, die durch *orf1*, *abcA* und *abcB* codiert werden, detailliert untersucht.

Das Gen *orf1* könnte für ein 36 AS langes Oligopeptid codieren. Allerdings besitzt das Genprodukt keine Homologie zu bekannten Proteinen. In einem Forschungspraktikum wurde gezeigt, dass *orf1* translatiert wird (Kammermann, 2007).

Das Gen *abcA* könnte für ein 252 AS langes Genprodukt codieren, da es eine große Homologie zu ATP-Bindeproteinen von ABC-Transportern besitzt. Diesen Proteinen gemeinsam sind verschiedene Motive (siehe 1.4.1), die in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *abcA* identifiziert werden konnten (Abb. 3. 38): das WalkerA-, und WalkerB-Motiv (Walker *et al.*, 1982), der A-, Q-, C-, D- und H-Loop (Ambudkar *et al.*, 2006; Davidson & Chen, 2004; Schmees *et al.*, 1999; Higgins, 1992). In einem Multialignment wurde *AbcA* mit den homologen ABC-Bindeproteinen *YsaC* aus *Lactococcus lactis* (61% Identität, bezogen auf 246 verglichene AS), *MbrA* aus *S. mutans* (57% Identität, bezogen auf 244 verglichene AS), *BceA* aus *Bacillus subtilis* (48% Identität, bezogen auf 248 verglichene AS) und *SalX* aus *S. salivarius* (42% Identität, bezogen auf 246 verglichene AS) verglichen.

MbrA	-MFLEINHLEKVFRTFRFSKEETHALQDVDFKVDKGEFIAIMGESGSGKTTLLNILATLEK
YsaC	-MLLEVKHLKKIKFKTRFSKEETALVDIDFGVEEGEYIAIMGESGSGKTTLLNILSTLEK
<b>AbcA</b>	<b>MTLLDVKHVQKIYKTRFQGNQVEALKDIHFTVEKGDYVAIMGESGSGKSTLLNILAMLDK</b>
BceA	MVILEANKIRKSYGNKLNKQ--EVLKGDIDHIEKGEFVVSIMGASGSGKTTLLNVLSSIDQ
SalX	----MKQLVLKDVCKKYPNQLNYALDHINLIVEKGEFVAVMGRSGSGKTTLLNVTSIIDK
	: : * . : : * . : : : : : : : * * * * * : : : :
	A-Loop Walker A
MbrA	PTNGAVILNGQDITKIRENNLAKFRLKNLGFVVFQDFNLLDTLSVKDNIFLPLVLARKDYK
YsaC	PTSGQVLLNKEDITAIKDKKESAFRRDHLGFVVFQDFNLLDTLNVRDNIYLPVLVSKSSVE
<b>AbcA</b>	<b>PSRGQVYLNQDITATIKNSQASSFRREKLGFFVQDFNLLDTLSVKDNILLPLVLSRRPIT</b>
BceA	VSHGTIHINGNDMTAMKEKQLAEFRKQHLGFIFQDYNLLDTLTVKENILLPLSITKLSKK
SalX	IDSGNIYCADKEISTFSDKEATNFRKNDIGFVVFQDYMLLDSLTIRENISVALSLKNVDSS
	* : : : : : : : * . : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
	Q-Loop
MbrA	EMEKHLYRLAPKLRIQNLEKRPFELS <del>SGGQ</del> KORVAIARSLITNPQILLADEPTAALDYRN
YsaC	LMKSRLKILAPKLNIE <del>NLLKQ</del> PFELS <del>SGGQ</del> KORVAVARALISQPDLLVLADEPTAALDFKN
<b>AbcA</b>	<b>EMM<del>KL</del>VVTAENLGINQLQEKYPYEIS<del>GGQ</del>KORVAVARAIITEPEILLADEPTGALDSKS</b>
BceA	EANRKFEEVAKELGIYELRDKYPNEISGGQKQRTSAGRAFIHDPSTIIFADEPTGALDSKS
SalX	KIDDLINSYAKRFNLYEQ <del>LK</del> KYPYQ <del>LSGGQ</del> RQ <del>RV</del> SIIRAI <del>IKD</del> PEIIFADEPTGALDLKS
	: * . : : : * * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : .
	C-Loop Walker B D-Loop
MbrA	SEDLLNLFEAINN-DDQTI <del>LMVTH</del> SANAASHAKRVLFIKDGRIFHQLYRGNKSNQEF <del>SKE</del>
YsaC	SEDLLNLFEEIND-SGQTI <del>IMVTH</del> S <del>SLA</del> AASHAKRVLFIKDGVLYHQLYRGEKSS <del>TEFAKE</del>
<b>AbcA</b>	<b>SAALLDV<del>FDEINE</del>-RGQTI<del>LMVTH</del>STAASRAKRVLFIKDGILYNQIYRGEKTERQMFQE</b>
BceA	ASDLLNKLSQLNQRNATIIMVTHDPVAASYCGRVIFIKDQMYTQLNKGQDRQ <del>TF</del> FFQD
SalX	SEETMMILSEINKTEKVTILMVTHD <del>VLS</del> SASYADRVILLKDGK <del>LHME</del> IDK--KDCGESFYD
	: : : . : * . * * * * * . * * . * * * * * : . : : : : :
	H-Loop
MbrA	ISLSMAALLGGE-----
YsaC	ITLSMIAFLGASEDEEVSLNA
<b>AbcA</b>	<b>ISDTLTVMASEVN-----</b>
BceA	IMKTQGVVLGGVQHEH-----
SalX	VISQALSDRGE-----
	:

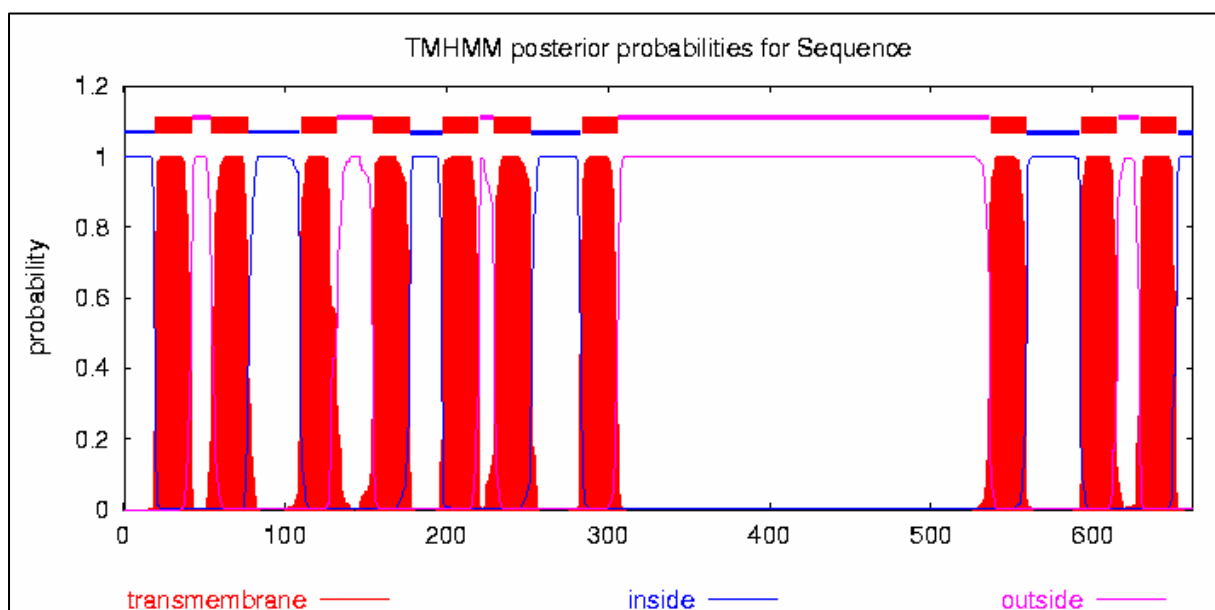
**Abb. 3. 38: Multialignment der Aminosäuresequenzen der ATP-Bindeproteine AbcA, MbrA, BceA, SalX und YsaA**

Die Sterne markieren identische Aminosäuren, die Doppelpunkte und die Punkte ähnliche Aminosäuren. Folgende Motive wurden identifiziert: Der A-Loop (grau), das WalkerA-Motiv (blau), der Q-Loop (grün), der C-Loop (pink), das WalkerB-Motiv (braun), der D-Loop (rot) und der H-Loop (orange). Die Aminosäuresequenz von AbcA wurde fett hervorgehoben (Genbanknummer: AbcA (*S. pneumoniae*): AAK99616; MbrA (*S. mutans*): BAB83943; YsaC (*L. lactis*): AAK05848; BceA (*B. subtilis*): O34697; SalX (*S. salivarius*): ABI63631).

Das Gen *abcB* umfasst 1989 bp und codiert vermutlich für ein 662 AS langes Protein. Das Genprodukt AbcB zeigt unter anderem Homologien zu den bereits näher charakterisierten Transmembranproteinen MbrB aus *S. mutans* (29% Identität, bezogen auf 685 verglichene AS) und BceB aus *Bacillus subtilis* (25% Identität, bezogen auf 593 verglichene AS). In einem Multialignment werden die Aminosäuresequenzen der Transmembranproteine AbcB, MbrB und BceB verglichen (Abb. 3. 39).



Mit Hilfe von Computerprogrammen können Vorhersagen über die Lokalisierung und die Topologie von Transmembranproteinen getroffen werden. Eine mit dem Computerprogramm TMHMM2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) erstellte Vorhersage der Proteins AbcB ergab eine Domänenanordnung aus zehn Transmembranhelices (Abb. 3. 40). Nach der siebten Transmembranhelix folgt eine längere extracytoplasmatische Sequenz von 229 AS (AS 307 bis AS 536) bevor sich drei weitere Transmembranhelices anschließen. In dem oben gezeigten Multialignment (Abb. 3. 39) der Transmembranproteine AbcB, MbrB und BceB sind die Transmembranhelices gelb markiert ([http://saier-144-37.ucsd.edu/tms\\_align.html](http://saier-144-37.ucsd.edu/tms_align.html)). Sowohl die N-terminalen Enden als auch die C-terminalen Enden der verglichenen Transmembranproteinen sind im Zellinneren lokalisiert.



**Abb. 3. 40: Vorhersage der Transmembrantopologie von AbcB**

Dargestellt sind die Transmembranhelices (rot) der Permease-UE AbcB mit dem Programm TMHMM2. Befinden sich AS außerhalb der Membran, so ist das durch eine rosa Linie angegeben, sind AS im Zellinneren, so ist das durch eine blaue Linie markiert.

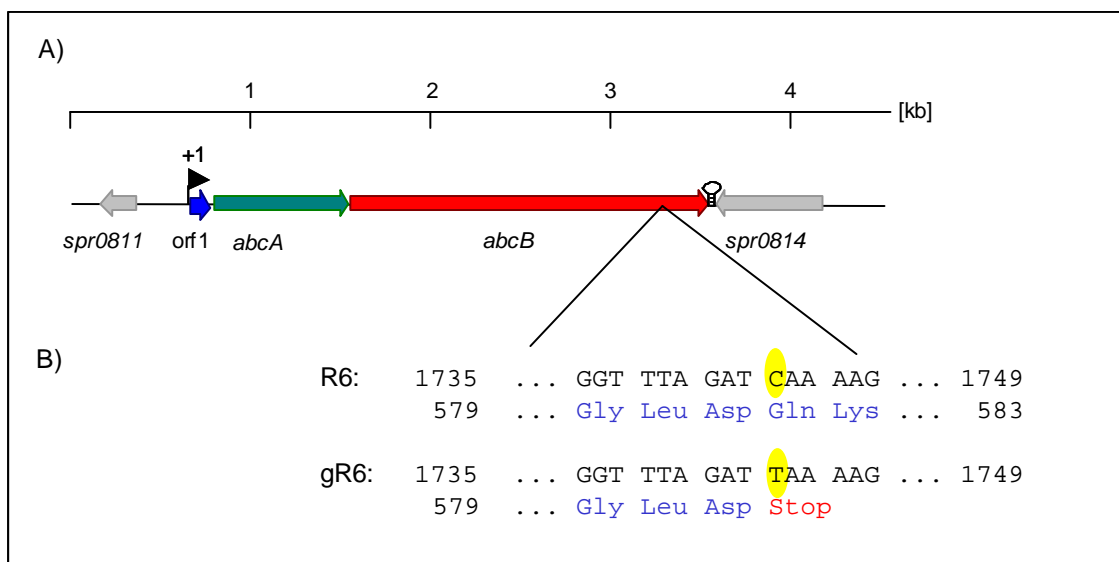
Ein funktionsfähiger ABC-Transporter setzt sich grundsätzlich aus vier UE (bzw. Domänen) zusammen, wobei zwei UE durch zwei ATP-Bindeproteine, und zwei UE durch zwei Transmembranproteine repräsentiert werden (siehe 1.4). Vermutlich setzt sich daher dieser ABC-Transporter aus zwei ATP-Bindeproteinen AbcA und zwei Transmembranproteinen AbcB (AbcA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) zusammen. Die Rolle des Genproduktes Orf1 ist nicht geklärt.

In einer Datenbank von Prof. Milton Saier ([www.tcdb.org](http://www.tcdb.org)) werden Membrantransportproteine in einem Transportklassifizierungssystem eingeordnet. Dieses TC-System (= transport classification system) basiert auf funktionellen und phylogenetischen Informationen. Nach Eingabe der Aminosäuresequenz des Transmembranproteins wird der entsprechende ABC-

Transporter durch eine fünfstellige TC-Nummer klassifiziert. Der ABC-Transporter orf1-AbcAB wurde wie folgt in das TC-System eingegliedert: Er wurde den primär aktiven Transportern (3.) zugeordnet, die durch Spaltung von Phosphatbindungen Energie gewinnen (3.A.). Dann wurde er der Superfamilie der ABC-Transportern (3.A.1.) zugeordnet, der sowohl Exporter als auch Importer angehören. In der vierten Ebene (3.A.1.123.) wurde er zu der Unterfamilie 'Pep4E-Familie' (Peptid-4 Exporter) gezählt und in der fünften Ebene (3.A.1.123.4) wurde er den Bacitracinresistenzproteinen MbrAB zugeordnet. Zu der Pep4E-Familie zählt auch der ABC-Transporter BceAB aus *Bacillus subtilis* (3.A.1.123.5) und SalXY (3.A.1.123.3) aus *S. salivarius*.

### 3.3.2.3.1 Identifizierung einer Punktmutation im Gen *abcB*

In der Mutante gR6 wurde das gesamte Operon orf1-*abcAB* inklusive 500 bp des aufwärts liegenden DNA-Bereiches doppelsträngig sequenziert. Am 3' Ende des Genes *abcB* an der Position bp 1744 konnte ein Basenaustausch von C zu T identifiziert werden. Diese Nonsensemutation führt während der Proteinbiosynthese zu einem vorzeitigen Abbruch des Peptids, da das Codon für Glutamin (CAA) in ein Stopcodon (TAA) geändert wurde (Abb. 3. 41). Das Protein verkürzt sich um 81 AS. Eine Permeaseuntereinheit besteht daher aus acht Transmembranhelices statt aus der vorhergesagten zehn Transmembranhelices (Abb. 3. 39, Abb. 3. 40).



**Abb. 3. 41: Identifikation einer Nonsensemutation im Gen *abcB***

A) Genetische Organisation des Operons orf1-*abcAB*

B) DNA-Sequenzausschnitt des Genes *abcB* im Referenzstamm R6 und in der Mutante gR6 (gelb markiert: Stelle der Nonsensemutation) mit abgeleiteter AS-Sequenz

### 3.3.2.3.2 Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit der Sequenz des mutierten Genes *abcB* und Bestimmung der MHK der Transformanten für Vancoresmycin

Durch Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit einem PCR-Produkt, das die identifizierte Punktmutation des Genes *abcB* der Mutante gR6 enthielt, sollte geprüft werden, ob sich eine Resistenz gegen Vancoresmycin in den vancoresmycinsensitiven Rezipienten R6 übertragen lässt. Dazu wurde ein 4,5 kb PCR-Produkt, 'orf1-*abcAB*', amplifiziert (Primer: spr0812\_up2 und spr0812\_down4; siehe Abb. 3. 36: PCR-Produkt entspricht dem gezeigten Ausschnitt), das zu dem Operon orf1-*abcAB* flankierende Bereiche (0,7 kb bzw. 1 kb) aufweist, um eine effiziente homologe Rekombination zu gewährleisten. Der sensitive Rezipient wurde mit jeweils 200 ng PCR-Produkt 'orf1-*abcAB*', genomischer DNA der Mutante gR6 (als Positivkontrolle) bzw. des Referenzstammes R6 (Negativkontrolle) transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Die Transformationseffizienz betrug bei Transformation des PCR-Produktes 0,0034% und bei Transformation der genomischen DNA der Mutante gR6 0,0036%.

Die Punktmutation im Gen *abcB* wurde durch eine Sequenzierung in den Transformanten nachgewiesen. Es wurden Transformanten in Flüssigkultur angezogen und als Glycerindauerkultur konserviert (gTR). Von diesem Stamm wurde der MHK-Wert und die EOP für Vancoresmycin ermittelt, um abzuklären, ob die Transformante gTR den gleichen Phänotyp wie die Mutante gR6 zeigt. Der MHK-Wert der Transformante gTR für Vancoresmycin, der aus dem Mittelwert dreier unabhängiger Experimenten gebildet wurde, erhöhte sich verglichen mit der MHK des Referenzstammes R6 um 0,1 µg/ml auf 0,5 µg/ml und erreichte damit das Niveau der Mutante gR6. Der Referenzstamm R6 besaß eine MHK für Vancoresmycin von 0,4 µg/ml. Zur Bestätigung wurde eine EOP für Vancoresmycin durchgeführt. Der Referenzstamm R6 fungierte als Negativkontrolle. Die EOP betrug für den Stamm gR6 7,1% und für den Stamm gTR 12,8%. Das Wachstum des Referenzstammes R6 war vollständig inhibiert.

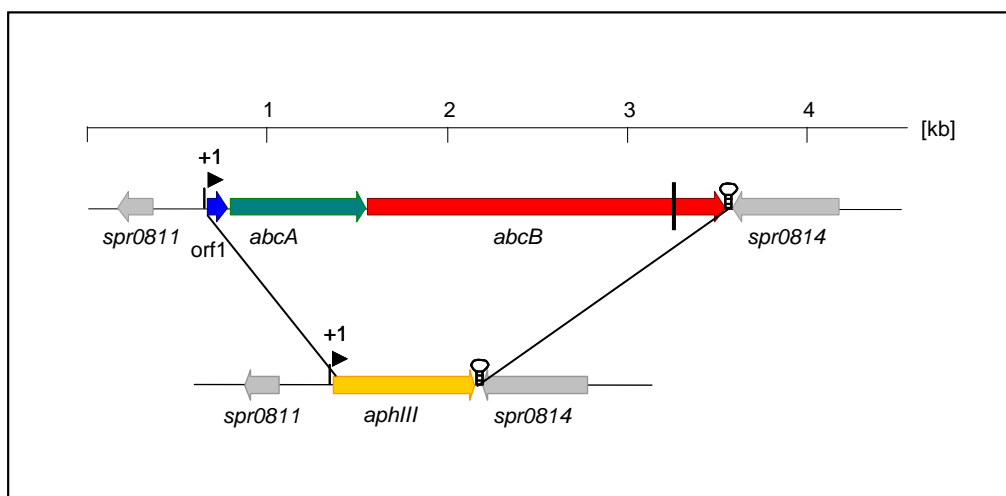
Durch Bestimmung der MHK und der EOP für Vancoresmycin war gezeigt worden, dass die Transformante gTR das gleiche Resistenzniveau wie die Mutante gR6 besitzt. Dieses Ergebnis wiederum offenbarte, dass die Punktmutation des Genes *abcB* die Ursache für die Vancoresmycinresistenz der Mutante gR6 sein kann.



### 3.3.2.3.3 Deletion des ABC-Transporter-Operons *orf1-abcAB* in R6, gR6 und gTR und Bestimmung der MHK für Vancoresmycin

Um weiter abzuklären, welchen Einfluss der ABC-Transporter auf die erhöhte Vancoresmycin-MHK der Stämme gR6 und gTR besaß, wurde das Operon *orf1-abcAB* deletiert und eine MHK-Bestimmung für Vancoresmycin durchgeführt.

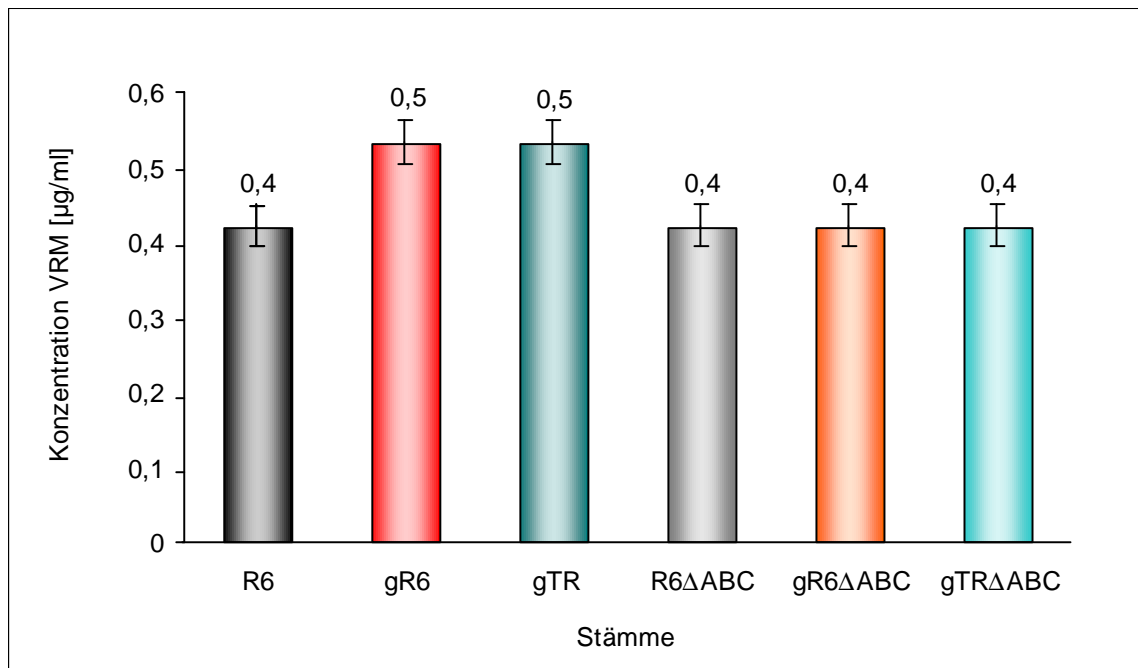
Das Operon *orf1-abcAB* wurde im Referenzstamm R6, in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR durch das Kanamycinresistenzgen *aphIII* ersetzt (Abb. 3. 42). Die Konstruktion wurde durchgeführt wie unter Kapitel 2.9 beschrieben. Dabei wurde das Operon folgendermaßen durch das Resistenzgen *aphIII* ersetzt: Das Operon (2874 bp) wurde ausgehend von dem Translationsinitiationscodon ATG des *orf1* bis hin zum Stopcodon TAA des Genes *abcB* durch das Gen *aphIII* (795 bp), ausgehend von dessen Translationsinitiationscodon ATG bis hin zu dessen Stopcodon TAG, ersetzt. Der Promotor  $P_{abc}$  und der potentielle Terminator blieben erhalten, so dass das Gen *aphIII* dem Promotor  $P_{abc}$  des ABC-Transporter-Operons unterstellt war. Durch eine Kontroll-PCR (Primer: *spr0812\_up1* und *spr0812\_down3*) wurde der Austausch des Operons *orf1-abcAB* durch das Resistenzgen *aphIII* in den Stämmen R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC bestätigt.



**Abb. 3. 42: Deletion des ABC-Transporter-Operons durch das Kanamycinresistenzgen *aphIII***

Das Operon *orf1-abcAB* wurde durch das Kanamycinresistenzgen *aphIII* (gelb) ersetzt. Der Transkriptionsstart (+1) und ein möglicher Terminator sind eingezeichnet. Der Balken gibt die Lage der Nonsensemutation im Gen *abcB* der Mutante gR6 an.

Von diesen Deletionsstämmen wurde die MHK für Vancoresmycin im Vergleich zum jeweiligen Parentalstamm in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Daraus wurde der Mittelwert gebildet (Abb. 3. 43).



**Abb. 3. 43: Bestimmung der MHK der Stämme R6, gR6, gTR, R6ΔABC, gR6ΔABC und gTRΔABC für Vancoresmycin**

Die MHK des Referenzstammes R6 (schwarz), der Mutante gR6 (rot), der Transformante gTR (grün) und deren entsprechende Deletionsstämme R6ΔABC (grau), gR6ΔABC (orange) und gTRΔABC (türkis) wurde auf D-Blutagarplatten mit steigenden Konzentrationen Vancoresmycin bestimmt. Die MHK-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Deletionsstämme gR6ΔABC und gTRΔABC hatten einen um 0,1 µg/ml erniedrigten MHK-Wert von 0,4 µg/ml Vancoresmycin im Vergleich zu den Parentalstämmen gR6 und gTR, die einen MHK-Wert von 0,5 µg/ml Vancoresmycin hatten. Der Stamm R6ΔABC unterschied sich nicht von dessen Parentalstamm R6, die beide eine MHK von 0,4 µg/ml Vancoresmycin aufwiesen.

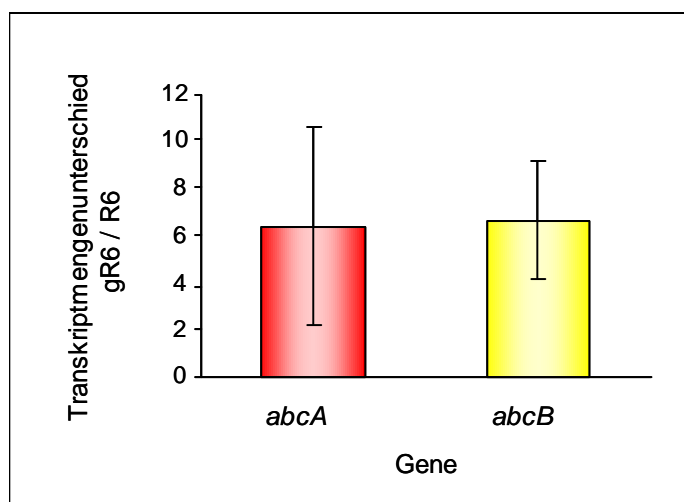
Parallel dazu wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsstämme R6ΔABC, gR6ΔABC und gTRΔABC im Vergleich zu den entsprechenden Parentalstämmen in C-Medium untersucht, um mögliche Veränderungen der Generationszeiten festzustellen. Die Generationszeiten betragen für alle Stämme zwischen 32 min und 36 min. Da für die Deletionsstämme keine abweichenden Generationszeiten beobachtet worden sind, ist gezeigt worden, dass eine Deletion des ABC-Transporter-Operons keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Deletionsstämme hat.

### 3.3.2.3.4 Verifizierung der erhöhten Transkriptmengen von *abcA* und *abcB* in gR6 und gTR mit Hilfe von qRT-PCR

In den durchgeführten Transkriptomanalysen (siehe 3.3.1.4) fielen die Gene *spr0812* (*abcA*) und *spr0813* (*abcB*) in der Mutante gR6 durch erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptmengen des Referenzstammes R6 auf. In der Mutante gR6 war die Transkriptmenge des ersten Genes *abcA* im Operon *orf1-abcAB* achtfach erhöht und die des zweiten Genes *abcB* zweifach. Mit Hilfe einer qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) sollten im Folgenden drei Fragestellungen geklärt werden:

- 1) Können die Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 verglichen mit dem Referenzstamm R6 verifiziert werden?
- 2) Unterscheidet sich in der Mutante gR6 die Transkriptmenge des Genes *abcA* von der des Genes *abcB*?
- 3) Gibt es Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Transformante gTR im Vergleich zum Referenzstamm R6 und zur Mutante gR6?

Die Unterschiede der Transkriptmengen wurden als Mittelwerte aus den Ergebnissen zweier unabhängiger Experimente angegeben (Abb. 3. 44, Abb. 3. 45). In der Mutante gR6 ist die Transkriptmenge des Genes *abcA* 6,4fach und die des Genes *abcB* 6,6fach im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptmengen der Gene des Referenzstammes R6 erhöht (Abb. 3. 44). Dadurch war bestätigt worden, dass die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 im Vergleich zu den Transkriptmengen der entsprechenden Gene im Referenzstamm R6 erhöht waren. Gleichzeitig wurde durch diesen Versuch gezeigt, dass sich die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* der Mutante gR6 nicht voneinander unterscheiden.

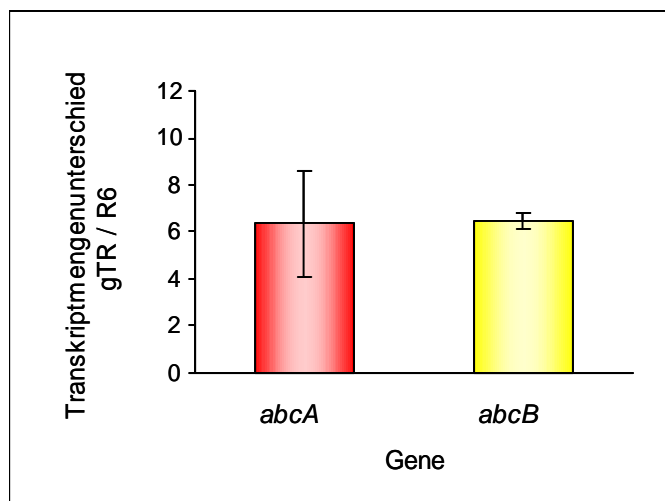


**Abb. 3. 44: Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in gR6**

Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* (rot) und *abcB* (gelb) in der Mutante gR6 im Vergleich zu den Transkriptmengen der entsprechenden Gene in R6. Es wurde der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen gebildet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Das bedeutet, dass die in den Transkriptomanalysen festgestellten Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* der Mutante gR6, in dem hier gezeigten Experiment durch qRT-PCR nicht bestätigt wurden.

In der Transformante gTR zeigte das Gen *abcA* eine 6,3fache Erhöhung der Transkriptmenge und das Gen *abcB* eine 6,5fache Erhöhung der Transkriptmenge im Vergleich zu den Transkriptmengen der entsprechenden Gene des Referenzstammes R6 (Abb. 3. 45). Dadurch war gezeigt worden, dass die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR im Vergleich zu den Transkriptmengen der entsprechenden Gene im Referenzstamm R6 erhöht vorlagen.



**Abb. 3. 45: Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in gTR**

Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen der Gene *abcA* (rot) und *abcB* (gelb) in der Transformante gTR im Vergleich zu den Transkriptmengen der entsprechenden Gene in R6. Es wurde der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen gebildet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.3.2.3.5 Bestimmung der Aktivität des Promotors $P_{abc}$ durch *lacZ*-Reporterfusionskonstrukte

In der Transkriptomanalyse der Mutante gR6 mit dem Referenzstamm R6 waren die Gene *abcA* und *abcB* durch erhöhte Transkriptmengen aufgefallen (siehe 3.3.1.4). Die erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* der Mutante gR6 wurden durch qRT-PCR verifiziert (siehe 3.3.2.3.4). Es stellte sich nun die Frage, wodurch die erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 und auch in der Transformante gTR zustande gekommen waren. Da eine erhöhte Transkriptmenge durch eine stärkere Transkription oder durch eine erhöhte Stabilität der Transkripte oder durch beides verursacht werden kann, wurde im folgenden Experiment die Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR im Vergleich zur Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  im Referenzstamm R6 untersucht. Die Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  wurde mit Hilfe des integrativen Promotor-Probe-Plasmids pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a; siehe 2.11) gemessen.

Zunächst sollte der ermittelte Promotor  $P_{abc}$  des ABC-Transporter-Operons (Abb. 3. 34) experimentell durch ein *lacZ*-Reporterfusionskonstrukt bestätigt werden. Der Promotorbereich wurde mit den Primern Pspr0812\_fwd1 und Pspr0812\_rev1 amplifiziert, die zum einen über eine *SphI*-Schnittstelle und zum anderen über eine *BamHI*-Schnittstelle verfügten (Abb. 3. 46). Nach Restriktionshydrolyse des PCR-Produktes und des Plasmides pPP2 mit *BamHI* und *SphI*, wurde der Vektor mit dem Insert ligiert. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und auf 100  $\mu$ g/ml Ampicillin selektioniert. Es wurden verschiedene Plasmide isoliert, die durch eine Kontroll-PCR (Primer: 274-lacZ und MCS\_fwd\_Kontr) und eine Sequenzierung überprüft wurden. Das Plasmid wurde als pPP2- $P_{abc}$  bezeichnet.

```

1 gcatgcctta tattttacaa ctttaaaaat aggaaatcaa atcattttct aagtaatttt
   SphI
61 gcttatatatt cacccaatct taaaaaaatg taagattaaa gtctcttttg taagggttagg

121 ttatggcaag cggctcttttt ttgatgtaaa ctagactcat aaagcctagg
      -35                -10                +1                BamHI

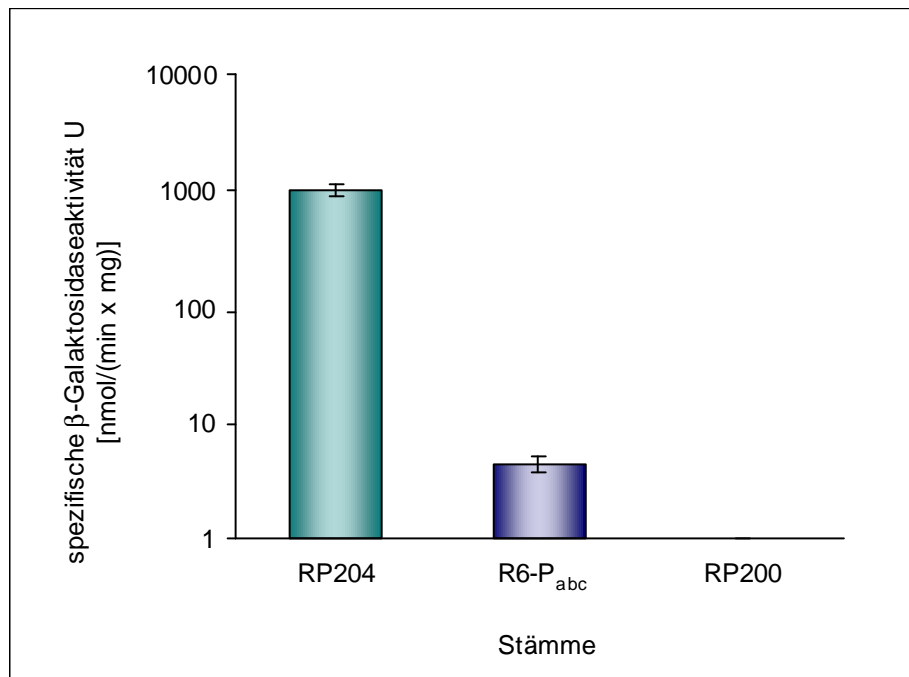
```

**Abb. 3. 46: Sequenz des Promotorinserts  $P_{abc}$**

Dargestellt ist das in den Vektor pPP2- $P_{abc}$  klonierte Insert mit den Schnittstellen *SphI* und *BamHI* (schwarz unterstrichen). Die -10- und die -35-Region sind grün markiert, der Transkriptionsstart +1 rot.

Der Referenzstamm R6 wurde mit diesem Plasmid transformiert und auf 3,0  $\mu$ g/ml Tetracyclin selektioniert. Bevor die Aktivität des Promotors durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays gemessen wurde, wurden die Transformanten erneut durch eine Kontroll-PCR (Primer: 274-lacZ und MCS\_fwd\_Kontr; bgaA\_rev\_Kontr und lacZ\_fwd\_Kontr) und eine Sequenzierung überprüft. Die Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  im Stamm R6\_ $P_{abc}$  wurde im Vergleich zu dem starken Promotor  $P_{vegM}$  im Stamm RP204 gemessen (Halfmann *et al.*, 2007a). Bei diesem Promotor handelt es sich um einen modifizierten Promotor, der von dem Promotor  $P_{vegII}$  aus *Bacillus subtilis* abstammte (Peschke *et al.*, 1985). Als Negativkontrolle diente der Stamm RP200 (Halfmann *et al.*, 2007a), der mit dem Plasmid pPP2 ohne Insert transformiert worden war.

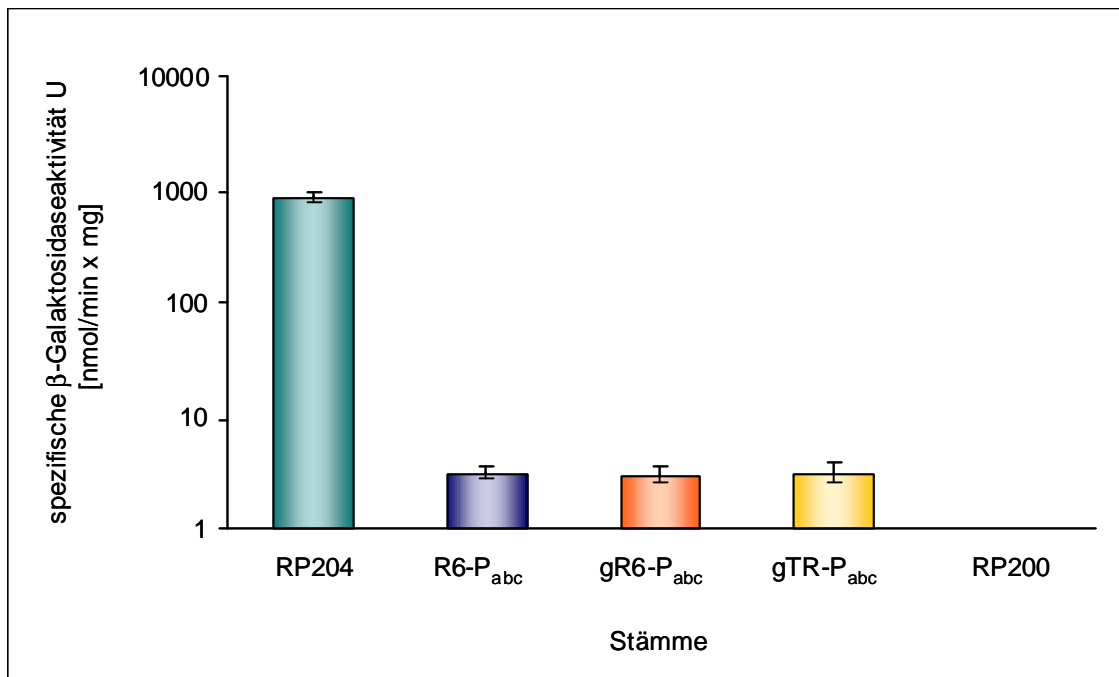
Die Aktivitätsbestimmungen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, woraus die Mittelwerte gebildet wurden (Abb. 3. 47). Durch die gezeigte Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  von 4,4 Units wurde der identifizierte Promotor bestätigt. Die Aktivität des Promotors  $P_{vegM}$  betrug annähernd 1000 Units. Die Negativkontrolle zeigte keine Aktivität.



**Abb. 3. 47: Messung der Aktivität des Promotors P<sub>abc</sub> durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays**

Die Aktivitäten der Promotoren P<sub>abc</sub> (dunkelblau) und P<sub>vegM</sub> (grün) wurden durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays verglichen. Als Negativkontrolle fungierte der Stamm RP200. Die Werte berechneten sich aus drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Um aufzuklären, ob sich die Aktivität des Promotors in den Stämmen gR6 und gTR im Vergleich zu R6 verändert, wurde die Mutante gR6 (gR6-P<sub>abc</sub>) und die Transformante gTR (gTR-P<sub>abc</sub>) mit dem Plasmid pPP2-P<sub>abc</sub> transformiert und auf 3,0  $\mu$ g/ml Tetracyclin selektioniert. Nach Kontrolle der Integration durch eine Kontroll-PCR (Primer: 274-lacZ und MCS\_fwd\_Kontr; bgaA\_rev\_Kontr und lacZ\_fwd\_Kontr) und durch eine Sequenzierung wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt, woraus der Mittelwert gebildet wurde. Die Aktivität der Promotoren P<sub>abc</sub> in gR6 bzw. gTR änderte sich im Vergleich zum Referenzstamm R6\_P<sub>abc</sub> nicht (Abb. 3. 48). Die Aktivität des Promotors P<sub>abc</sub> im Referenzstamm R6 betrug 3,0 Units, in der Mutante gR6 2,9 Units und in der Transformante gTR 3,0 Units. Die Negativkontrolle zeigte keine Aktivität. Der Promotor P<sub>vegM</sub> im Stamm RP204 zeigte eine Aktivität von 830 Units.



**Abb. 3. 48: Messung der Aktivität des Promotors P<sub>abc</sub> in den Stämmen R6-P<sub>ABC</sub>, gR6-P<sub>ABC</sub> und gTR-P<sub>ABC</sub> durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays**

Die Aktivität des Promotors P<sub>abc</sub> wurde in den Stämmen R6-P<sub>ABC</sub> (blau), gR6-P<sub>ABC</sub> (orange) und gTR-P<sub>ABC</sub> (gelb) durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays bestimmt. Der Promotor P<sub>vegM</sub> diente als Positivkontrolle, der Stamm RP200 als Negativkontrolle. Die Werte berechneten sich aus drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

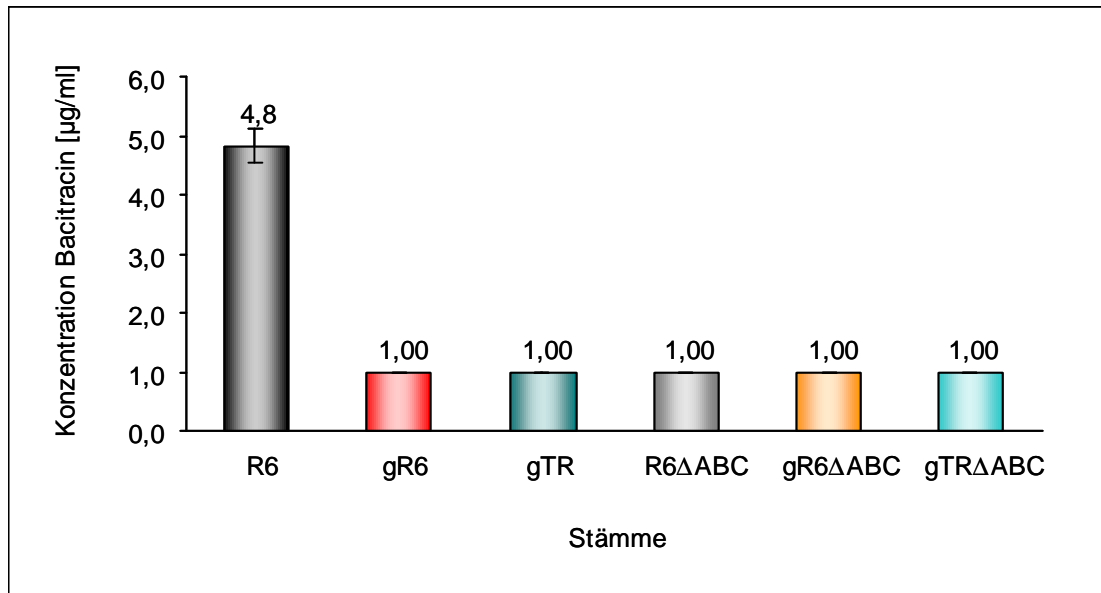
Durch diesen Versuchsansatz konnte geklärt werden, dass die erhöhte Transkriptmenge des Operons *orf1-abcAB* in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR nicht durch eine erhöhte Promotoraktivität zustande kam. Die erhöhte Transkriptmenge des Operons *orf1-abcAB* der Mutante gR6 bzw. der Transformante gTR ist damit möglicherweise Ausdruck einer erhöhten mRNA-Stabilität.

### 3.3.2.3.6 Bestimmung der MHK für Bacitracin

Wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben wurde, wurde der ABC-Transporter Orf1-AbcAB nach dem TC-System in die Gruppe 3.A.1.123.4 eingeordnet. Prototyp dieser Gruppe stellt der ABC-Transporter MbrAB aus *S. mutans* dar (Tsuda *et al.*, 2002). In *S. mutans* wird der ABC-Transporter von den Genen *mbrA* und *mbrB* codiert. Im Gegensatz zu *S. pneumoniae* R6 befinden sich stromabwärts der Gene *mbrA* und *mbrB* zwei weitere Gene, *mbrC* und *mbrD*, die für ein regulatorisches Zwei-Komponenten-System codieren.

Aufgrund dieser Klassifizierung und der bestehenden Homologie (siehe 3.3.2.3) zu dem ABC-Transporter MbrAB aus *S. mutans* lag die Vermutung nahe, dass der ABC-Transporter Orf1-AbcAB in eine Resistenz gegen Bacitracin involviert sein könnte. Daher wurde die MHK der Stämme R6, gR6, gTR, R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC für Bacitracin

bestimmt. Der Mittelwert der MHK wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet (Abb. 3. 49). Der MHK-Wert des Referenzstammes R6 für Bacitracin betrug 4,8  $\mu\text{g/ml}$ , im Gegensatz dazu nahm der MHK-Wert der Mutante gR6 und der Transformante gTR für Bacitracin auf 1,0  $\mu\text{g/ml}$  ab. Die MHK der Deletionsstämme R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC betrug für Bacitracin ebenfalls 1,0  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abb. 3. 49: MHK-Bestimmung der Stämme R6, gR6, gTR, R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC für Bacitracin**

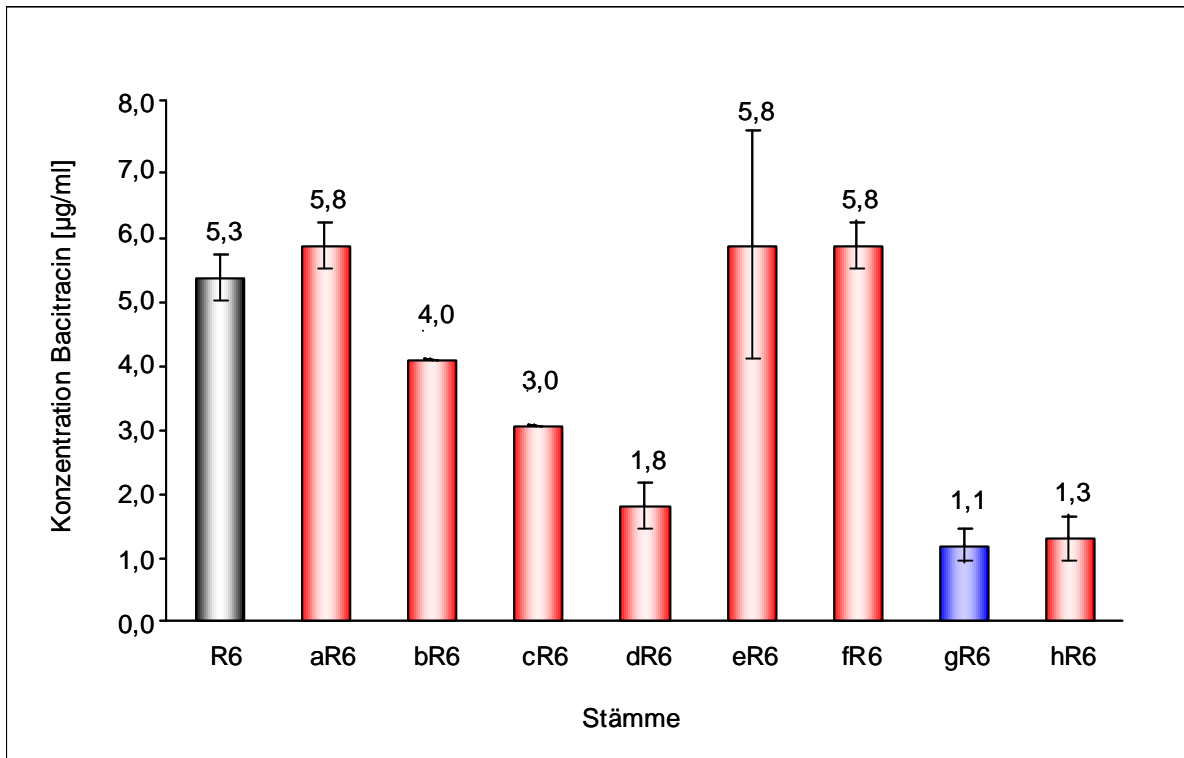
Es wurde die MHK der Stämme R6 (schwarz), der Mutante gR6 (rot), der Transformante gTR (grün), der Deletionsstämme R6 $\Delta$ ABC, (grau) gR6 $\Delta$ ABC (gelb) und gTR $\Delta$ ABC (türkis) für Bacitracin auf D-Blutagarplatten mit steigenden Konzentrationen Bacitracin bestimmt. Der MHK-Wert gibt den Mittelwert dreier unabhängiger MHK-Bestimmungen an. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass nur der Stamm R6, der den regulären ABC-Transporter Orf1-AbcAB aufweist, resistenter gegen Bacitracin ist als die anderen untersuchten Stämme. Sowohl die Deletionsstämme R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC als auch die Stämme gR6 und gTR zeichneten sich durch eine erhöhte Sensitivität gegen Bacitracin aus.

Da die Mutante gR6 eine erhöhte Sensitivität gegen Bacitracin zeigte, sollten nun auch die MHK der anderen Mutanten für Bacitracin ermittelt werden. Der MHK-Wert wurde aus dem Mittelwert dreier MHK-Bestimmungen gebildet. Wie aus Abb. 3. 50 ersichtlich ist, unterscheiden sich die MHK-Werte der Mutante aR6, eR6 und fR6 nicht voneinander. Sie liegen mit 5,8  $\mu\text{g/ml}$  etwas höher als die MHK des Referenzstammes R6, der einen MHK-Wert von 5,3  $\mu\text{g/ml}$  aufweist. Die MHK-Werte der Mutanten bR6 und cR6 liegen mit 4,0  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  unter der MHK des Referenzstammes. Besonders interessant sind die



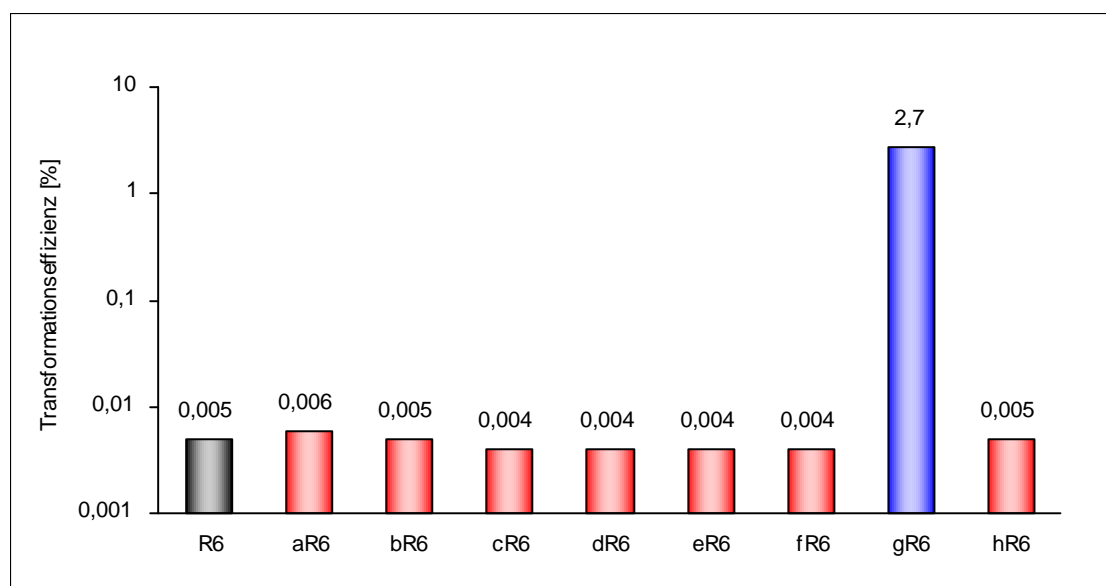
MHK-Werte der Mutanten dR6 (1,8 µg/ml), gR6 (1,1 µg/ml) und hR6 (1,3 µg/ml), die weit unter dem Niveau des Referenzstammes R6 liegen.



**Abb. 3. 50: MHK-Werte der Mutanten und des Referenzstammes R6 für Bacitracin**

Die MHK-Bestimmung der Stämme R6 (schwarz) und der Mutanten aR6-hR6 (rot; außer gR6: blau) für Bacitracin wurde auf D-Blutagarplatten mit steigenden Bacitracinkonzentrationen in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, wobei der Mittelwert gebildet wurde. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Da die Mutanten unterschiedliche MHK-Werte für Bacitracin aufwiesen und da mögliche Resistenzdeterminanten in den anderen Mutanten noch nicht identifiziert worden waren, wurde nun das Operon *orf1-abcAB* mit flankierenden Bereichen von genomischer DNA der einzelnen Mutanten amplifiziert und in den sensitiven Rezipienten R6 transformiert. Dazu wurde ein 4,5 kb PCR-Produkt ('*orf1-abcAB*') mit den Primern *spr0812\_up2* und *spr0812\_down4* ausgehend von der genomischen DNA der einzelnen Mutanten amplifiziert (Abb. 3. 36: PCR-Produkt entspricht dem gezeigten Ausschnitt). Der sensitive Rezipient R6 wurde jeweils mit 200 ng PCR-Produkt '*orf1-abcAB*' transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektioniert. Als Negativkontrolle diente das PCR-Produkt amplifiziert von genomischer R6-DNA, als Positivkontrolle das PCR-Produkt amplifiziert von genomischer DNA der Mutante gR6. Wie aus Abb. 3. 51 hervorgeht, übertrug nur das PCR-Produkt amplifiziert von der Mutante gR6 eine Vancoresmycinresistenz. Dabei betrug die Transformationseffizienz 2,7%.



**Abb. 3. 51: Effizienzen der Transformation des Referenzstammes R6 mit den aus den Mutanten amplifizierten PCR-Produkten 'orf1-abcAB'**

Das Operon *orf1-abcAB* wurde von genomischer DNA aller Mutanten und des Referenzstammes R6 mit den Primern *spr0812\_up2* und *spr0812\_down4* amplifiziert. Der sensitive Referenzstamm R6 wurde mit den entsprechenden PCR-Produkten transformiert und auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin selektiert (blau: PCR-Produkt aus gR6; rot: PCR-Produkt aus den entsprechenden Mutanten; schwarz: PCR-Produkt aus R6; halblogarithmische Darstellung).

Dieses Transformationsexperiment zeigte, dass die aus den jeweiligen Mutanten amplifizierten PCR-Produkte '*orf1-abcAB*' keine Vancoresmycinresistenz auf den sensitiven Stamm R6 übertragen. Dies wiederum ist ein Beleg dafür, dass der entsprechende ABC-Transporter Orf1-AbcAB der anderen Mutanten nicht an einer Vancoresmycinresistenz beteiligt ist.

Da die Mutanten unterschiedliche MHK-Werte für Bacitracin haben, müssen weitere Resistenzdeterminanten in die Resistenz bzw. Sensitivität gegen Bacitracin und gegen Vancoresmycin involviert sein. Aus den letzten beiden Experimenten ging hervor, dass die einzelnen Mutanten unterschiedliche und unabhängige Resistenzdeterminanten besitzen.

## 4 Diskussion

Zur Identifizierung genetischer Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin in *S. pneumoniae* wurden vancoresmycinresistente Labormutanten ausgehend von *S. pneumoniae* R6 isoliert und phänotypisch charakterisiert.

Im ersten Diskussionsteil werden Unterscheidungsmerkmale der Mutanten im Vergleich zueinander und zum Referenzstamm R6 erörtert.

Potentielle Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin wurden zum einen mit Hilfe von Genbanken und zum anderen mit Hilfe mikroarraybasierter Transkriptomstudien identifiziert. Die Rolle der identifizierten Genloci *rpsI*, *dexS*, *copY*, 'Cyl-Operon' sowie *abcB* an der Resistenz gegen Vancoresmycin wird im zweiten und dritten Diskussionsteil ausführlich diskutiert.

Im letzten Teil der Diskussion wird detailliert auf das ABC-Transporter-Operon *orf1-abcAB* eingegangen, das bedingt durch eine Nonsensemutation im Gen *abcB* (*spr0813*) in der Mutante gR6 an der Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt ist. Dabei werden die Eigenschaften des ABC-Transporters Orf1-AbcAB in Zusammenhang mit einer erhöhten Resistenz gegen Vancoresmycin und einer erhöhten Sensitivität gegen Bacitracin gebracht.

### 4.1 Unterschiede der vancoresmycinresistenten Labormutanten

Zu Beginn dieser Arbeit wurden acht vancoresmycinresistente Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 isoliert (siehe 3.1.1). Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen Mutanten voneinander unterscheiden und sie deshalb vermutlich verschiedene Resistenzdeterminanten aufweisen (siehe 3.1, 3.3.2.3.6). In Tab. 4.1 wird eine kurze Zusammenfassung der Unterscheidungsmerkmale der Mutanten wiedergegeben.

Bereits die unterschiedlichen MHK-Werte der einzelnen Mutanten für Vancoresmycin weisen auf das Vorhandensein unterschiedlicher Resistenzdeterminanten hin (siehe 3.1.2). Die Mutanten zeigen eine Erhöhung der MHK für Vancoresmycin auf bis zu 0,7 µg/ml Vancoresmycin im Vergleich zum Referenzstamm R6, der eine MHK für Vancoresmycin von 0,4 µg/ml besitzt. Die Mutanten aR6, eR6 und fR6 zeichnen sich dabei durch die höchsten MHK-Werte von 0,7 µg/ml, 0,65 µg/ml bzw. 0,7 µg/ml Vancoresmycin aus. Die anderen Mutanten zeigen eine MHK von 0,5 µg/ml (bR6, cR6, gR6 und hR6) bzw. 0,55 µg/ml (dR6).

Durch die unterschiedlichen MHK-Werte der Mutanten für Bacitracin gibt es einen weiteren Hinweis auf die Existenz verschiedener Resistenzdeterminanten in den einzelnen Mutanten (siehe 3.3.2.3.6). Die MHK-Werte der Mutanten aR6, eR6 und fR6 liegen mit 5,8 µg/ml

Bacitracin etwas höher als der MHK-Wert des Referenzstammes R6, der eine MHK von 5,3 µg/ml Bacitracin aufweist. Im Gegensatz zu den Mutanten aR6, eR6 und fR6 sind die MHK-Werte der Mutanten dR6, gR6 und hR6, die zwischen 1,8 µg/ml und 1,1 µg/ml Bacitracin liegen, deutlich unter dem MHK-Wert des Referenzstammes R6. Die MHK-Werte der Mutanten bR6 und cR6 liegen bei 4,0 µg/ml bzw. 3,0 µg/ml Bacitracin und sind damit auch unter dem MHK-Wert des Referenzstammes R6.

**Tab. 4. 1: Vergleich der vancoresmycinresistenten Mutanten mit dem Referenzstamm R6**

Die Mutanten werden hinsichtlich ihrer MHK für Vancoresmycin und Bacitracin, der Transformationseffizienz ihrer genomischen DNA in den sensitiven Rezipienten R6 und ihrer im Transkriptom auffälligsten Gene mit dem Referenzstamm R6 verglichen (n. b., nicht bestimmt).

	R6	aR6	bR6	cR6	dR6	eR6	fR6	gR6	hR6
MHK Vancoresmycin [µg/ml]	0,4	0,7	0,5	0,5	0,55	0,7	0,65	0,5	0,5
MHK Bacitracin [µg/ml]	5,3	5,8	4,0	3,0	1,8	5,8	5,8	1,1	1,3
Transformationseffizienz genomischer DNA und Selektion auf 0,5 µg/ml Vancoresmycin [%]	0,001	2,9	0,001	0,001	0,001	1,6	1,8	0,01	0,01
auffällig erhöhte Transkriptmengen	Referenz	<i>copY</i> , Cyl-Operon	n. b.	n. b.	n. b.	<i>copY</i> , Cyl-Operon	<i>copY</i> , Cyl-Operon	<i>abcA</i> , <i>abcB</i>	n. b.

Durch Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit gleichen Mengen genomischer DNA der einzelnen Mutanten, wurden verschiedene Transformationseffizienzen festgestellt (siehe 3.1.5). Genomische DNA der Mutanten aR6, eR6 und fR6 übertrug am effizientesten die Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Empfängerstamm R6 (2,9%, 1,6% bzw. 1,8%). Im Gegensatz dazu wurde die jeweilige Resistenz gegen Vancoresmycin bei Transformation mit genomischer DNA der Mutanten bR6, cR6 und dR6 deutlich ineffizienter übertragen (0,001%). Die Resistenzdeterminanten der Mutanten gR6 und hR6 wurden mit 0,01% auf den Rezipienten R6 übertragen. Aus diesem Resultat kann abgeleitet werden, dass in den einzelnen Mutanten verschiedene Resistenzdeterminanten vorliegen. Eine niedrige Transformationseffizienz kann darauf hindeuten, dass mehrere Determinanten an einer Resistenz beteiligt sind, die einzeln transformiert keine ausreichende Resistenz vermitteln.

Aufgrund der hohen Übertragungseffizienz ihrer Resistenzdeterminanten wurden die Mutante aR6 für die Erstellung von Genbanken und die Mutanten aR6, eR6 und fR6 für die Transkriptomanalysen ausgewählt. Dabei könnte die jeweilige hohe Übertragungseffizienz ein Hinweis auf die Beteiligung eines einzigen Genlocus der jeweiligen Mutante an einer Resistenz sein.

Mit Hilfe mikroarraybasierter Transkriptomstudien wurde gezeigt, dass sich die Transkriptome der Mutanten aR6, eR6 und fR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6 unterscheiden (siehe 3.3.1.1, 3.3.1.2 und 3.3.1.3). Besonders auffällig waren dabei in allen drei Mutanten die erhöhten Transkriptmengen des Genes *copY* und der Gene des Cyl-Operons. Diese Übereinstimmungen deuten möglicherweise auf eine gleiche Resistenzdeterminante in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 hin. Diese These wird durch die MHK-Werte für Bacitracin und für Vancoresmycin der Mutanten aR6, eR6 und fR6 sowie durch die Transformationseffizienz bei Transformation des sensitiven Rezipienten R6 mit genomischer DNA der Mutanten aR6, eR6 und fR6 unterstützt, da die Werte der Mutanten aR6, eR6 und fR6 übereinstimmen und sich von den Werten der anderen Mutanten unterscheiden (Tab. 4. 1). Außerdem zeigen die Mutanten aR6, eR6 und fR6 in Flüssigkultur ein ähnliches Wachstumsverhalten (siehe 3.1.3, Abb. 3. 3), das sich von dem des Referenzstammes R6 und dem der anderen Mutanten unterscheidet. Diese Mutanten zeichnen sich durch eine im Vergleich zum Referenzstamm R6 verkürzte Stationärphase von etwa 3 h aus. Weiterhin zeigen die Mutanten aR6, eR6 und fR6 nach Zugabe von 0,25 µg/ml Vancoresmycin ein ähnliches Wachstumsverhalten (siehe 3.1.4).

Ein weiteres Indiz für die Existenz verschiedener Resistenzdeterminanten stellt das in Abhängigkeit der Vancoresmycinkonzentration beobachtete Wachstumsverhalten dar (siehe 3.1.4). Hier gibt es sowohl im Vergleich der einzelnen Mutanten untereinander als auch mit dem Referenzstamm R6 Unterschiede. Die Mutanten aR6, eR6 und fR6 zeigen nach Zugabe von 0,25 µg/ml Vancoresmycin ein ähnliches Wachstumsverhalten, das sich teilweise von dem der anderen Mutanten unterscheidet (siehe 3.1.4). Vor allem das Wachstumsverhalten der Mutante bR6 nach Zugabe von 0,5 µg/ml Vancoresmycin war auffällig, so dass von unterschiedlichen Mutanten ausgegangen werden kann.

Mit Hilfe von Transkriptomstudien wurde in der Mutante gR6 ein ABC-Transporteroperon, *orf1-abcAB*, identifiziert, das aufgrund einer Nonsensemutation im Gen *abcB*, eine Resistenzhöhung gegen Vancoresmycin vermittelt (siehe 3.3.2.3.1, 3.3.2.3.2). Die entsprechenden ABC-Transporter-Operons der anderen Mutanten übertrugen durch Transformation der entsprechenden DNA-Sequenz keine Resistenz auf den sensitiven Rezipienten R6 (siehe 3.3.2.3.6). Dadurch wurde experimentell bestätigt, dass die ABC-Transporter Orf1-AbcAB der anderen Mutanten nicht in eine Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sind. Dieses Ergebnis ist daher auch ein Beleg für die Existenz unterschiedlicher Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin in den einzelnen Mutanten.

Durch Zugabe von Vancoresmycin in wachsende Kulturen konnte gezeigt werden, dass es sich bei Vancoresmycin um ein bakteriolytisches Antibiotikum handelt, da die Zelldichten der untersuchten Kulturen nach Zugabe von Vancoresmycin abnahmen (siehe 3.1.4).

Bakteriolytische Antibiotika führen eine Zellyse herbei, in dem sie oft hemmend in die Zellwandsynthese eingreifen oder die Zytoplasmamembran schädigen (Madigan *et al.*, 2001). Diese bakteriolytische Eigenschaft von Vancoresmycin deutet möglicherweise auf die zelluläre Zielstruktur von Vancoresmycin hin, die demzufolge an bzw. in der Zellwand existieren könnte.

## 4.2 Genetische Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin

Die Identifikation potentieller Resistenzdeterminanten dient zum besseren Verständnis von Resistenzmechanismen. Außerdem können dadurch Hinweise auf die zelluläre Zielstrukturen eines Antibiotikums erhalten werden. Zur Identifizierung entsprechender Resistenzdeterminanten wurden Genbanken und Transkriptomstudien von verschiedenen Mutanten durchgeführt.

### 4.2.1 Erstellung von Genbanken zur Identifizierung von Resistenzdeterminanten

Das Erstellen und Screenen von Genbanken ist eine etablierte Methode zur Identifikation unbekannter DNA-Sequenzen. Mit Hilfe dieser Methode konnten in der Vergangenheit verschiedene Resistenzdeterminanten identifiziert werden, wie z. B. *cpoA* aus *S. pneumoniae* (Grebe *et al.*, 1997; *cpoA* codiert für eine Glycosyltransferase) oder *alrA* aus *Mycobacterium smegmatis* (Cáceres *et al.*, 1997; *alrA* codiert für eine D-alaninracemase). Die Eignung dieser Methode wurde auch in dieser Arbeit zum Anlass genommen, Genbanken von der vancoresmycinresistenten Mutante aR6 zu erstellen und nach Vancoresmycinresistenz vermittelnden Determinanten zu screenen.

In einem ersten Ansatz wurden zwei angereicherte Genbanken unter Verwendung des high-copy-number Vektors pUH89 erstellt (siehe 3.2.1.1). Da es sich bei dem Vektor pUH89 um einen high-copy-number Vektor handelt, liegt das klonierte DNA-Fragment auch in hoher Kopiezahl vor. Wenn das klonierte DNA-Fragment ein für den Wirtsorganismus schädliches Genprodukt codiert, und dieses exprimiert wird, so liegt dieses Genprodukt ebenfalls in hohen Mengen vor, was für den Wirt lethal sein könnte. Nach einem Screening von insgesamt 950 Plasmiden konnten keine resistenzvermittelnden DNA-Sequenzen identifiziert werden. Die Ursache des ergebnislosen Screenings kann an der hohen Kopiezahl der Plasmide pro Zelle liegen. Zur Vermeidung einer zu hohen Kopiezahl, wurde eine weitere angereicherte Genbank in dem low-copy-number Vektor pWSK129 angelegt (siehe 3.2.1.2). Dieser Vektor sollte gewährleisten, dass die Plasmide in einer Kopiezahl von sechs bis acht Kopien pro Zelle im Wirtsorganismus vorhanden sind (Wang & Kushner, 1991). Die neu erstellte Genbank führte jedoch ebenfalls zu keiner Detektion von DNA-Sequenzen, die dem sensitiven Rezipienten R6 eine Resistenz gegen Vancoresmycin verleihen. In den Vektor pWSK129 wurde die 5-3kb Fraktion der mit *Hpa*II restringierten DNA der Mutante aR6

kloniert. Dabei betrug die durchschnittliche Insertgröße 3 kb, was bedeutete, dass größere Fragmente (>3 kb) relativ selten kloniert worden waren. Möglicherweise lag der gesuchte Resistenzmarker auf einem größeren DNA-Fragment, das nicht bzw. ineffizient kloniert worden war und deshalb nicht identifiziert werden konnte.

Um auszuschließen, dass die Resistenzmarker in einer angereicherten Genbank nicht effizient kloniert werden würden, wurde das vollständige Genom der Mutante aR6 in einer Fosmidgenbank angelegt. Die Fosmide der eingelagerten Fosmidgenbanken lagen als Einzelfosmide in der Wirtszelle vor und sollten deshalb in einer geringeren Wahrscheinlichkeit zu einer Instabilität des Fosmides bzw. zur Schädigung des Wirtes führen.

Nach Abschluss der Screeningverfahren zweier Fosmidgenbanken, die insgesamt 1728 Klone enthielten, konnten drei Fosmide ermittelt werden, die eine Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Rezipienten R6 übertrugen (siehe 3.2.1.3, 4.2.1.1 und 4.2.1.2).

Insgesamt wurden fünf Genbanken unter der Verwendung verschiedener Vektoren von der Mutante aR6 angelegt und hinsichtlich der Anwesenheit von Determinanten für die Resistenz gegen Vancoresmycin gescreent. Dabei konnten verschiedene Resistenzdeterminanten identifiziert werden, bei denen es sich jedoch nicht um die gesuchten Resistenzdeterminanten der Mutante aR6 handelte.

Die Repräsentativität der Fosmidgenbanken wurde bestätigt, da fünf willkürlich ausgewählte Gene durch PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten (siehe Tab. 3. 2). Außerdem wurden insgesamt 1728 Fosmide gescreent, die das gesamte Genom theoretisch mehr als drei Mal abgedeckt haben sollten. Aufgrund dieser Tatsachen können drei mögliche Erklärungen in Betracht kommen, weshalb die gesuchten Vancoresmycinresistenzvermittelnden DNA-Sequenzen der Mutante aR6 nicht gefunden wurden.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass sich die Resistenzdeterminante der Mutante aR6 aus zwei einzelnen Determinanten zusammensetzt, die nur durch gemeinsame Transformation einen resistenten Phänotyp verursachen. Wenn durch die Transformation nur eine Komponente übertragen wird, kann diese allein keine ausreichende selektionierbare Resistenz gegen Vancoresmycin vermitteln.

Zum anderen könnte die gesuchte Resistenzdeterminante in *E. coli* nicht klonierbar sein. In einer aktuellen Veröffentlichung diskutiert Sorek *et al.* (2007) die Problematik nicht klonierbarer Gene im Wirtsorganismus *E. coli*. Dabei wurde gezeigt, dass Gene, deren Genprodukte in die Proteinbiosynthese involviert sind, schwer in Genbanken mit *E. coli* als Wirtsorganismus detektiert werden konnten. Besonders bei Vertretern der *Firmicutes* sind

Gene, die für ribosomale Proteine codieren, in *E. coli* nicht klonierbar (Sorek *et al.*, 2007). Die Ursache liegt unter anderem darin, dass die Promotoren AT-reicher Mikroorganismen von der Transkriptionsmaschinerie *E. colis* erkannt werden und deren Genprodukte exprimiert werden, die für den Wirtsorganismus schädlich sein können (Dillard & Yother, 1991). Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass Gene aus GC-reichen Organismen häufiger in *E. coli* klonierbar sind als Gene aus AT-reichen Organismen, da die Promotoren aus GC-reichen Organismen seltener von *E. coli* erkannt und deren Genprodukte dadurch seltener exprimiert werden.

Auch ist es vorstellbar, dass sich die gesuchten Resistenzdeterminanten in unmittelbarer Nähe von nicht klonierbaren Genen befinden. Falls diese Möglichkeit auf die Resistenzdeterminante(n) der Mutante aR6 zutrifft, ist es nur schwer möglich, diese in Genbanken mit *E. coli* als Wirtsorganismus zu identifizieren.

Mit Hilfe der Fosmidgenbanken konnten drei Fosmide identifiziert werden, die bei Transformation des sensitiven Rezipienten R6 eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin übertrugen. Wie sich herausstellte, war das Insertionselement IS10-R in das Gen *rpsI* bzw. in das Gen *dexS* insertiert. In den folgenden Kapiteln wird darauf eingegangen, inwiefern die Insertion des IS10-R in die Gene *rpsI* bzw. *dexS* an der Resistenz gegen Vancoresmycin beteiligt sein könnte.

#### 4.2.1.1 Das Gen *rpsI*

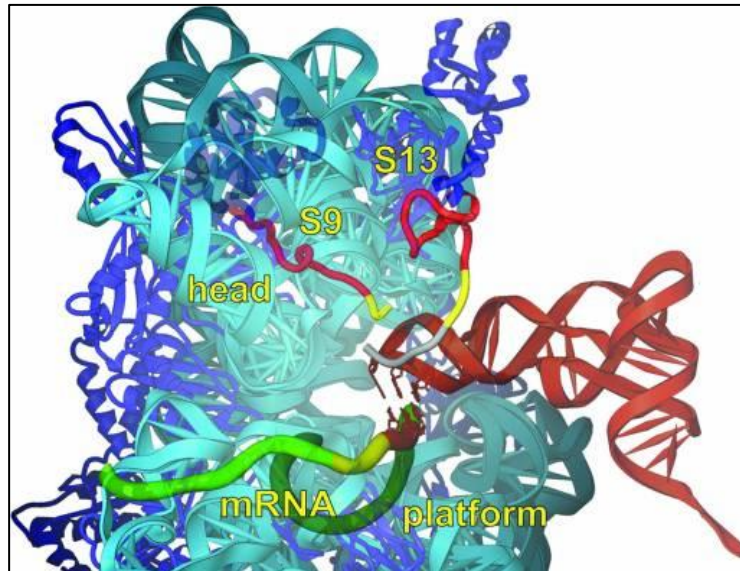
Beim Screening der Fosmidgenbanken der Mutante aR6 wurde unter anderem ein Fosmid (E/C2) identifiziert (siehe 3.2.1.3, 3.2.2.1), das dem sensitiven Rezipienten R6 durch Transformation eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin verleiht. Es wurde durch Sequenzierung und anschließende Analyse festgestellt, dass das Insertionselement IS10-R in das Gen *rpsI*, das für das kleine ribosomale Protein S9 codiert, insertiert ist. Die letzten sechs AS des ursprünglichen C-terminalen Endes des ribosomalen Proteins S9 wurden durch 55 neue, weitgehend hydrophobe AS ersetzt.

Für verschiedene Antibiotika, wie z. B. für Kasugamycin (Schuwirth *et al.*, 2006), für Tetracyclin (Brodersen *et al.*, 2000) und für Streptomycin (Carter *et al.*, 2000) wurde durch Kristallstrukturen gezeigt, dass sie an die kleine UE des Ribosoms binden und dadurch die entsprechende Funktion während der Proteinbiosynthese beeinträchtigen. Zudem wurde bereits in den siebziger Jahren das Gen *rpsI* als Resistenzdeterminante des Antibiotikums Kasugamycin beschrieben (Dabbs, 1978; Dabbs, 1983). Aus diesen Gründen wurde das Gen *rpsI* als mögliche Resistenzdeterminante erachtet und weiter untersucht.

Das ribosomale Protein S9, das von *rpsI* codiert wird, besteht in *S. pneumoniae* aus 130 AS. Durch Kristallstrukturanalysen der 30S UE und des 70S-Ribosom-tRNA-Komplexes konnte in



*Thermus thermophilus* gezeigt werden, dass die C-terminalen Enden der ribosomalen Proteine S9 und S13 mit der Anticodonschleife der tRNA an der Peptidbindungsstelle (P-Stelle) der 30S UE interagieren (Abb. 4. 1; Hoang *et al.*, 2004; Yusupov *et al.*, 2001; Wimberly *et al.*, 2000).



**Abb. 4. 1: Interaktion der C-terminalen Enden von S9 und S13 mit tRNA (rot) in *Thermus thermophilus*, 30S UE, P-Stelle (Hoang *et al.*, 2004)**

Die Länge des C-terminalen Endes des ribosomalen Proteins S9 ist sehr ausgeprägt und über alle phylogenetischen Gruppen konserviert. Das C-terminale Ende ragt dabei aus der globulären Domäne in die P-Stelle der 30S-UE heraus. Es endet ausnahmslos mit einem Argininrest (Hoang *et al.* 2004; Noller *et al.*, 2005). Die konservierte Länge des C-terminalen Endes des Proteins S9 beruht auf der Position der Anticodonschleife, die sich direkt in Verlängerung des Proteins S9 befindet, so dass der konservierte Argininrest mit dem Phosphatrest 35 am Scheitelpunkt der Anticodonschleife interagieren kann (Abb. 4. 1; Hoang *et al.* 2004; Noller *et al.*, 2005).

In einer Arbeit von Hoang *et al.* (2004) wurden die Funktionen der C-terminalen Enden der Proteine S9 und S13 in *Thermus thermophilus* untersucht, indem verschiedene Deletionen am C-terminalen Ende der beiden Proteine durchgeführt wurden. Alle konstruierten Deletionsmutanten konnten wachsen, wenn auch z. T. verlangsamt. Dadurch wurde u. a. nachgewiesen, dass die C-terminalen Enden und die universell konservierte AS Arginin am C-terminalen Ende von S9 nicht essentiell sind.

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm R6-*rpsL*::IS10-R zeichnete sich durch ein verlängertes ribosomales Protein S9 und durch ein im Vergleich zum Referenzstamm R6 verlangsamtes Wachstumsverhalten aus. Durch das verlängerte Protein S9 kann vermutlich eine Interaktion des C-terminalen Endes mit der Anticodonschleife nicht mehr stattfinden, so

dass möglicherweise die Translationseffizienz verringert wird, was sich in einer Wachstumshemmung widerspiegeln könnte.

Unter der Annahme, dass die Insertion des IS10-R in das Gen *rpsI* zu einer verringerten Translationseffizienz führt, da das C-terminale Ende verändert vorliegt, könnte die erhöhte Vancoresmycinresistenz entweder eine direkte Folge oder eine indirekte Folge der verringerten Translationseffizienz sein. So könnte beispielsweise spekuliert werden, dass Vancoresmycin direkt am Ribosom interagiert und dadurch das Wachstum inhibiert. Durch das veränderte Protein RpsI\* könnte Vancoresmycin schlechter an sein zelluläres Target gelangen, wodurch die erhöhte Resistenz des Stammes R6-*rpsI*::IS10-R zu erklären wäre. Des Weiteren könnte auch angenommen werden, dass Vancoresmycin an einem anderen zellulären Target angreift und es durch das verlangsamte Wachstum schlechter an sein Target gelangt, so dass es zu einer erhöhten Resistenz kommt, wie es bei dem Stamm R6-*rpsI*::IS10-R der Fall wäre.

In Anbetracht der verminderten Wachstumsrate könnte auch spekuliert werden (siehe 3.2.2.1, Abb. 3. 21), dass der Stamm R6-*rpsI*::IS10-R widerstandsfähiger gegenüber dem Antibiotikum Vancoresmycin geworden ist. Dies könnte mit Bakterien in Biofilmen verglichen werden, die u. a. durch ihr verlangsamtes Wachstum gegenüber verschiedener Antibiotika unempfindlich geworden sind (Costerton *et al.*, 1999; Brown *et al.* 1988).

#### 4.2.1.2 Das Gen *dexS*

Beim Screening der Fosmidgenbanken der Mutante aR6 wurden zwei weitere Fosmide (M-C8 und S-E11) identifiziert (siehe 3.2.1.3, 3.2.2.2), die eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin auf den sensitiven Rezipienten R6 übertrugen. Wie sich herausstellte, war in beiden Fällen das Gen *dexS* durch die Insertion des IS10-R an unterschiedlichen Positionen unterbrochen.

Bei dem Protein DexS handelt es sich um eine Dextranoglucosidase, die große Homologien zu Glucosidasen aus anderen *Streptococccen* besitzt, wie z. B. zu TreA aus *S. mutans* (75% Identität, bezogen auf 538 verglichene AS), zu DexS aus *S. sanguinis* (80% Identität, bezogen auf 540 verglichene AS) und zu DexS aus *S. suis* (67% Identität, bezogen auf 548 verglichene AS). Es konnte aber auch eine Ähnlichkeit zu TreC (47% Identität, bezogen auf 537 verglichene AS), einer Trehalose-6-phosphatase aus *E. coli* festgestellt werden, die Trehalose-6-phosphat in Glucose und Glucose-6-Phosphat spaltet (Rimmele & Boos, 1994). Aus den Homologievergleichen (Abb. 4. 2) geht hervor, dass es sich bei DexS wahrscheinlich um eine Endohydrolase handelt, die 1,6 $\alpha$ -D-glykosidische Bindungen hydrolysiert.

Unter den *Streptococccen* sind besonders die oralen *Streptococccen* für die Produktion von Dextranasen bekannt (Colby *et al.*, 1995; Felgenhauer & Trautner, 1982; Hamada & Slade, 1980; Walker *et al.*, 1981). Der allgemeine Begriff der Dextranasen umfasst dabei eine große Anzahl verschiedener Glykosylhydrolasen, die das Polymer Dextran an unterschiedlichen Stellen degradieren können. Diese werden im Allgemeinen konstitutiv exprimiert und benötigen zur Genexpression keine Saccharose im Wachstumsmedium (Khalikova *et al.*, 2005). Dextranasen werden zum einen in der Zuckerindustrie und zum anderen in der Medizin angewandt, um das Polymer Dextran zu degradieren (Khalikova *et al.*, 2005). Als Resistenzdeterminanten sind Dextranasen bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Im aktiven Zentrum von Glucosidasen sind fünf konservierte Aminosäuren beschrieben worden (Watanabe *et al.*, 1990, 1991), die u. a. auch in DexS aus *S. suis* (Serhier *et al.*, 1997), in DexB aus *S. mutans* (Aduse-Opoku *et al.*, 1991) und in TreC aus *E. coli* (Rimmele & Boos, 1994) vorkommen. Diese konnten ebenso in DexS aus *S. pneumoniae* und DexS aus *S. sanguinis* identifiziert werden (Abb. 4. 2; His<sub>101</sub>, Asp<sub>191</sub>, Glu<sub>243</sub>, His<sub>317</sub>, Asp<sub>318</sub>).

Außerdem wurden einige konservierte Prolinreste in DexS aus *S. suis* (Serhir *et al.*, 1997), in DexB aus *S. mutans* (Aduse-Opoku *et al.*, 1991), in TreC aus *E. coli* (Rimmele & Boos, 1994) sowie in Oligo-1,6-Glucosidasen aus *B. cereus* und *B. thermoglucosidiasus* (Watanabe *et al.*, 1991) identifiziert, die auch in DexS aus *S. pneumoniae* nachgewiesen werden konnten (Abb. 4. 2; Pro<sub>14</sub>, Pro<sub>50</sub>, Pro<sub>55</sub>, Pro<sub>129</sub>).

In Abb. 4. 2 ist jeweils die letzte AS des Genfusionsproduktes DexS::IS10-R\_A bzw. DexS::IS10-R\_B, die das DexS umfassen, angegeben (pink: DexS::IS10-R\_B; türkis: DexS::IS10-R\_A). Im Fall A) (türkis) umfasst das Produkt noch 96 AS und im Fall B) (pink) noch elf der ursprünglichen 541 AS des DexS. Eine hydrolytische Aktivität scheint in beiden Fällen ausgeschlossen, da das aktive Zentrum vollständig fehlt.

Es wurde gezeigt, dass der Stamm R6-*dexS*::IS10-R\_B eine höhere EOP gegen Vancoresmycin besitzt als der Stamm R6-*dexS*::IS10-R\_A (Abb. 3. 25), so dass die erhöhte Resistenz vermutlich nicht auf die neu entstandenen Genprodukte (codiert durch orf2 bzw. orf4 in Abb. 3. 23) zurückzuführen ist. Die möglichen orfs orf1 bzw. orf3 scheinen zu einer Resistenz ebenfalls nicht beizutragen, da sie vermutlich aufgrund einer fehlenden Ribosomenbindestelle nicht translatiert werden.



*sanguinis*): ABN45133; TreA (*S. mutans*): AAN59639; DexS (*S. suis*): AAB65079; TreC (*E. coli*): AAC77196)

Durch die Deletion des Genes *dexS* wurde gezeigt, dass dessen Genprodukt nicht in die Resistenz gegen Vancoresmycin involviert ist, da keine Veränderung in der Bestimmung der EOP im Vergleich zum Referenzstamm R6 aufgetreten ist (siehe 3.2.2.2, Abb. 3. 25). Allerdings wurde deutlich, dass die Stämme R6-*dexS*::IS10-R (A) und R6-*dexS*::IS10-R (B) resistenter sind als der Referenzstamm R6 und der Deletionsstamm R6- $\Delta$ *dexS*, aber nicht das Niveau der Mutante aR6 erreichen. Durch Sequenzierung des Genes *dexS* der Mutante aR6 konnte eine Sequenzveränderung ausgeschlossen werden (siehe 3.2.2.2). Außerdem wurde durch die Deletion des Genes *dexS* bewiesen, dass es sich um ein nicht essentielles Gen handelt.

Das Wachstumsverhalten der Stämme R6-*dexS*::IS10-R\_A und R6-*dexS*::IS10-R\_B unterschied sich nicht von dem des Referenzstammes R6 (siehe 3.2.2.2, Abb. 3. 26), so dass eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin aufgrund eines verlangsamten Wachstum ausgeschlossen werden kann (siehe 4.2.1.1).

Unter der Annahme es handele sich bei DexS um ein Enzym, das hydrolytische Aktivität besitzt, könnte folgendes Modell spekuliert werden: Das Enzym DexS spaltet den Aminozucker des Vancoresmycins ab und aktiviert dadurch das Antibiotikum. Das aktivierte Antibiotikum führt zu einer verminderten Resistenz (R6). Wenn das Enzym DexS funktionslos ist, wie z. B. in den Stämmen R6-*dexS*::IS10-R\_A und R6-*dexS*::IS10-R\_B, so wird der Aminozucker nicht mehr abgespalten, das Antibiotikum wird nicht mehr aktiviert und der entsprechende Stamm wird resistenter gegen Vancoresmycin. Allerdings hätte unter dieser Annahme auch der Stamm R6 $\Delta$ *dexS* eine erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin zeigen müssen.

Auch könnte spekuliert werden, dass die Expression des downstream liegenden Genes *spr1697* durch die Insertion des IS10-R verändert worden ist, wodurch die erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin vermittelt wird. Möglicherweise ist deshalb das Genprodukt Spr1697, bei dem es sich um ein Transmembranprotein handeln könnte, an der Resistenz beteiligt. Im Stamm R6 $\Delta$ *dexS* kommt es vermutlich zu keiner Expressionsveränderung, da das Gen *dexS* in frame deletiert worden ist.

#### 4.2.1.3 Das Insertionselement IS10-R

Durch das Screening zweier Fosmidgenbanken, wurden drei Fosmide identifiziert, die dem sensitiven Rezipienten R6 bei Transformation Resistenz gegen Vancoresmycin verleihen (siehe 3.2.1.3). Bei den identifizierten Resistenzdeterminanten *rpsI* und *dexS* handelte es sich jedoch nicht um die gesuchte Resistenzdeterminante der Mutante aR6, sondern um

Determinanten, deren eigentliche Genfunktion durch Insertion des IS10-R beeinträchtigt worden ist. In der Literatur sind verschiedene IS-Elemente im Genom von *S. pneumoniae* beschrieben worden, jedoch nicht das IS10-R. Das *S. pneumoniae* R6 Genom besitzt über 60 vollständige bzw. unvollständige Kopien von IS-Elementen, die zehn unterschiedlichen IS-Familien angehören, wie z. B. den Familien ISL3, IS5, IS630, IS3, IS30 und IS605 (Hoskins *et al.*, 2001).

Das IS10-R (1329 bp) flankiert zusammen mit dem IS10-L das Tn10, das zur Herstellung verschiedener *E. coli* Wirtsstämme wie DH10B und HS996 verwendet wurde (Kleckner *et al.*, 1977). Das IS10-R, das sich durch 16 Basenpaare von IS10-L unterscheidet, transponiert dabei wesentlich effizienter als IS10-L (Chalmers *et al.*, 2000). Tn10 codiert unter anderem für einen Tetracyclinresistenzmarker, der nach einer Stammkonstruktion wieder eliminiert werden kann (Bochner *et al.*, 1980; Maloy & Nunn, 1981). Offensichtlich wurden dabei einige IS-Elemente im Wirtstamm zurückgelassen, die in einer Frequenz von etwa  $10^{-4}$  pro Zelle pro Bakteriengeneration transponieren (Hill *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 1987).

Da der für die Fosmidbank verwendete *E. coli* Stamm EPI300™ vermutlich ein Derivat des Wirtstammes DH10B darstellt (Herstellerangaben, Wild *et al.*, 2002) und da das IS10-R durch ein PCR-Produkt in diesem Stamm nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3. 18), wird davon ausgegangen, dass es sich bei den identifizierten IS10-R um ein Relikt der DH10B Stammkonstruktion handelt. Während der Genbankerstellung transponierte das IS10-R aus dem Genom des Wirtstammes *E. coli* EPI300™ in die Fosmide E/C2, M-C8 und S-E11.

In einer Studie von Hill *et al.* (2000) wurde nachgewiesen, dass viele Genbankeinträge durch das Insertionselement IS10-R kontaminiert und nicht als solche gekennzeichnet sind. Diese Tatsache ist als ein Resultat der Stammkonstruktion mit Tn10 anzusehen.

## 4.2.2 Transkriptomanalysen zur Identifizierung von Resistenzdeterminanten

### 4.2.2.1 Das Gen *copY*

Der Transkriptionsrepressor CopY, der von *copY* codiert wird, reguliert wahrscheinlich die Expression der Gene *copY*, *spr0640* und *copA* (Reyes *et al.*, 2006), deren Genprodukte in den Kupfermetabolismus involviert sind. In Transkriptomanalysen fiel das Gen *copY* durch erhöhte Transkriptmengen in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 im Vergleich zu der entsprechenden Transkriptmenge des Referenzstammes R6 auf (siehe 3.3.1.1, 3.3.1.2, 3.3.1.3). CopY ist dem CopY aus *Enterococcus hirae* (33% Identität, bezogen auf 131 verglichene AS) und dem CopR aus *Lactococcus lactis* (34% Identität, bezogen auf 129 verglichene AS) homolog. In einem Multialignment sind die genannten Transkriptionsregulatoren aufgeführt (Abb. 4. 3)

Diese wiederum zeigen Homologie zu einigen anderen bakteriellen negativen Transkriptionsregulationsproteinen (COG3682), wie z. B. Mecl (29% Identität, bezogen auf 117 verglichene AS) und Blal (23% Identität, bezogen auf 117 verglichene AS) aus *Staphylococccen* (Safo *et al.*, 2005) und PenI (26% Identität, bezogen auf 119 verglichene AS) aus *Bacillus licheniformis* (Wittman *et al.*, 1993), die die Expression von Penicillinasen-codierenden Genen regulieren. CopY bzw. die homologen Proteine CopY aus *Enterococcus hirae* und CopR aus *Lactococcus lactis* sind nicht als mögliche Resistenzdeterminanten von Antibiotika beschrieben worden.

CopY_E.hirae	MEEKRVLIKISDSEWEVVRVIWTLGQANAQQITQILADSMWVKVATVKTLLGRLVKKEAL
CopR_L._lactis	--MNEVEFNVSNAELIVMRVIWSLGEARVDEIYAQIPQELWVSLATVKTLLGRLVKKEML
CopY_S._pneumoniae	-----MQISDAEWQVMKIIWMQGEQTSTDLIRVLAERFDWSKSTVQTLLSRLVEKECL
	::*:::* **::** *: :: :.: :*: :***::**::** * * * *
CopY_E.hirae	WTEQEGKKFIYHPAVSEMENVRSAATENLFSHICAKRVGATIADLVEEATLTQEDIQQIMK
CopR_L._lactis	STEKEGRKFVYRPLMEECTAINLMADGLIQVCETKXVNVLQEMIEKSTLTAKDIELLQE
CopY_S._pneumoniae	TRKKEGKSFVYSALLTLDQSRDLLVQDIKDKVCSRRIRNLLADLIVECEFTQTDLEDLEA
	::**::*:* . : . : . : . : * : : : : . : * * : : :
CopY_E.hirae	QLNKKE--PVETIECNCIP--GQCECKKQ-----
CopR_L._lactis	SLNAKE--VVGQKHCNCLETSGLCACKHEHEQISA
CopY_S._pneumoniae	VISEKKSSAVTEVRCNCM-----
	: . * : * .***:

**Abb. 4. 3: Multialignment der Aminosäuresequenzen der Transkriptionsrepressoren CopY (*S. pneumoniae*), CopR (*L. lactis*) und CopY (*E. hirae*)**

Die Sterne markieren identische Aminosäuren, die Doppelpunkte und die Punkte ähnliche Aminosäuren. (Genbanknummer: CopY (*S. pneumoniae*): AAK99443; CopY (*E. hirae*): CAA86835; CopR (*L. lactis*): AAK04930)

Transkriptionsrepressoren, die in den Kupfermetabolismus involviert sind, binden an das konservierte Motiv **T A C A X X T G T A** (wobei X ein beliebiges Nukleotid darstellt), das sich stromaufwärts des Transkriptionsrepressor codierenden Genes befindet (Portman *et al.*, 2004). In einem Genomvergleich von sechzehn verschiedenen Arten der *Lactobacillales* wurde gezeigt, dass dieses Motiv meistens zweimal vorhanden ist, so auch in *Enterococcus hirae* und *S. pneumoniae* (Reyes *et al.*, 2006). Es wurde ebenso festgestellt, dass das Motiv einiger Arten einen Basenaustausch aufwies, wie z. B. in *S. pneumoniae* (**G A C A X X T G T A**, wobei X ein beliebiges Nukleotid darstellt; Reyes *et al.*, 2006). Für die Transkriptionsrepressoren Mecl, Blal und PenI wurde ebenfalls das konservierte Motiv **T A C A X X T G T A** beschrieben (Safo *et al.*, 2005).

Außerdem wurde in *Lactococcus lactis* nachgewiesen, dass der zu CopY homologe Transkriptionsrepressor CopR nicht nur das stromabwärts gelegene Gen *copA*, das für eine Kupfertransportierende ATPase (CopA) codiert, reguliert, sondern auch die Expression elf weiterer Gene, deren Genprodukte unterschiedliche Funktionen besitzen (Magnani *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um *lctO* (NAD-unabhängige Laktatoxidase), *ytjD*

(Nitroreduktase), *copB* (Kupfertransportierende ATPase, die für den Export intrazellulären Kupfers verantwortlich ist), *ydiD* (NADH-Azoreduktase) und die Operone *yahCD-yaiAB* (YahC: Protein mit unbekannter Funktion; YahD: hypothetische Phospholipase, Carboxyesterase; YaiA: Glyoxylase; YaiB: putative Flavoprotein Oxygenase) sowie *copRZA* (CopR: Transkriptionsrepressor; CopZ: Kupferchaperon; CopA: Kupfertransportierende ATPase, die Kupfer importiert). Das konservierte Motiv, die 'cop-Box', wurde vor den genannten Genen identifiziert. Allerdings steht in den meisten Fällen der funktionelle Zusammenhang der Expression der aufgeführten Gene mit dem Transkriptionsregulator CopR noch aus (Magnani *et al.*, 2008).

Aufgrund dieser Befunde ist es möglich, dass CopY in *S. pneumoniae* R6 weitere Gene reguliert, die in die Resistenz gegen Vancoresmycin involviert sind. Allerdings konnte nicht geklärt werden, wodurch letztendlich die erhöhte Transkriptmenge des Genes *copY* bedingt wurde. Da die DNA-Sequenz des Genes *copY* in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6 unverändert vorlag und da durch Deletion des Genes *copY* in den Mutanten keine Resistenzunterschiede im Vergleich zu den entsprechenden Parentalmutanten detektiert werden konnten (siehe 3.3.2.1.1), handelt es sich bei der erhöhten Transkriptmenge des Genes *copY* möglicherweise um einen sekundären Effekt, der durch eine bisher nicht identifizierte Resistenzdeterminante verursacht worden ist.

#### 4.2.2.2 Die Gene des Cyl-Operons

Die Gene des Cyl-Operons (*spr1764* bis *spr1773*) fielen in Transkriptomstudien durch erhöhte Transkriptmengen in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 im Vergleich zum Referenzstamm R6 auf.

Nach Austausch des Cyl-Operons gegen die Spectinomycinresistenzkassette in den Mutanten aR6, eR6 und fR6 wurde eine EOP-Bestimmung dieser Stämme für Vancoresmycin im Vergleich zu den entsprechenden Parentalstämmen und zum Referenzstamm R6 durchgeführt (siehe 3.3.2.2, Abb. 3. 32). Da keine Unterschiede zwischen den Deletionsstämmen und den entsprechenden Mutanten detektiert werden konnten, war klar, dass es sich bei den Genprodukten des Cyl-Operons nicht um die gesuchten Resistenzdeterminanten der Mutanten aR6, eR6 und fR6 handelte. Die Ursache der erhöhten Transkriptmengen der Gene des Cyl-Operons ist unbekannt, und könnte durch eine bisher noch nicht identifizierte Resistenzdeterminante hervorgerufen worden sein.



#### 4.2.2.3 Das ABC-Transporter-Operon *orf1-abcAB*

Das ABC-Transporter-Operon *orf1-abcAB*, dessen Gene vermutlich für einen ABC-Transporter codieren, wurde detailliert in Bezug auf die Resistenz gegen Vancoresmycin analysiert, da dessen Gene *abcA* und *abcB* durch erhöhte Transkriptmengen in Transkriptomstudien aufgefallen waren.

Der ABC-Transporter *AbcAB* zeigt Homologien zu den ABC-Transportern *MbrAB* aus *S. mutans* (Tsuda *et al.*, 2002) und *BceAB* aus *Bacillus subtilis* (Bernard *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003), die gemäß des TC-Systems ebenfalls in die ABC-Transporter-Familie 3.A.1.123 eingeordnet werden (siehe 3.3.2.3, Abb. 3. 38, Abb. 3. 39). Da diese ABC-Transporter als Resistenzdeterminanten gegen Bacitracin beschrieben wurden, wurde *Orf1-AbcAB* aus *S. pneumoniae* ebenfalls im Hinblick auf die Resistenz gegen Bacitracin untersucht.

In dieser Arbeit wurde im 3' Ende des Genes *abcB* der Mutante *gR6* eine Punktmutation identifiziert (siehe 3.3.2.3.1). Diese Nonsensemutation führt auf Proteinebene zu einem Verlust von 81 C-terminalen AS des ursprünglichen Permeaseproteins *AbcB*, so dass das mutierte Protein nur noch acht von zehn vorhergesagten TMH enthält. Durch Transformation des sensitiven Rezipienten *R6* mit der DNA-Sequenz, die diese Nonsensemutation enthielt, wurde eine erhöhte Vancoresmycinresistenz übertragen (siehe 3.3.2.3.2). Die Nonsensemutation wurde in der Transformante *gTR* durch Sequenzierung bestätigt. Da die MHK-Werte der Mutante *gR6* und der Transformante *gTR* für Vancoresmycin (siehe 3.3.2.3.2) und auch für Bacitracin überein stimmten (siehe 3.3.2.3.6), war gezeigt worden, dass die erhöhte Resistenz gegen Vancoresmycin und die erhöhte Sensitivität gegen Bacitracin allein durch Transformation der Nonsensemutation bedingt war.

Durch die identifizierte Punktmutation im Gen *abcB* wurde gezeigt, dass Resistenzen durch Mutationen in Genen, die für eine Permeaseuntereinheit eines ABC-Transporters codieren, erzeugt werden können. Auch der eukaryotische ABC-Transporter P-Glycoprotein stellt eine bedeutende Resistenzdeterminante dar, da er durch Mutationen in der Permease seine Substratspezifität im Vergleich zum ursprünglichen P-Glycoprotein verändern kann (Devine *et al.*, 1992; Kajiji *et al.*, 1993; Loo & Clarke, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch verschiedener AS die Ursache einer erhöhten Resistenz gegen Actinomycin D, Colchicin, Vinchristin und Daunorubicin sind (Devine *et al.*, 1992).

Die Gene *abcAB* der Mutante *gR6* fielen im Transkriptomvergleich mit dem Referenzstamm *R6* durch erhöhte Transkriptmengen auf (siehe 3.3.1.4). Dabei zeigte das Gen *abcA* eine zehnfach und das Gen *abcB* eine zweifach erhöhte Transkriptmenge. Dieser Transkriptmengenunterschied wurde mit Hilfe von qRT-PCR verifiziert (siehe 3.3.2.3.4). Die Transkripte beider Gene waren im Vergleich zu den entsprechenden Transkripten des

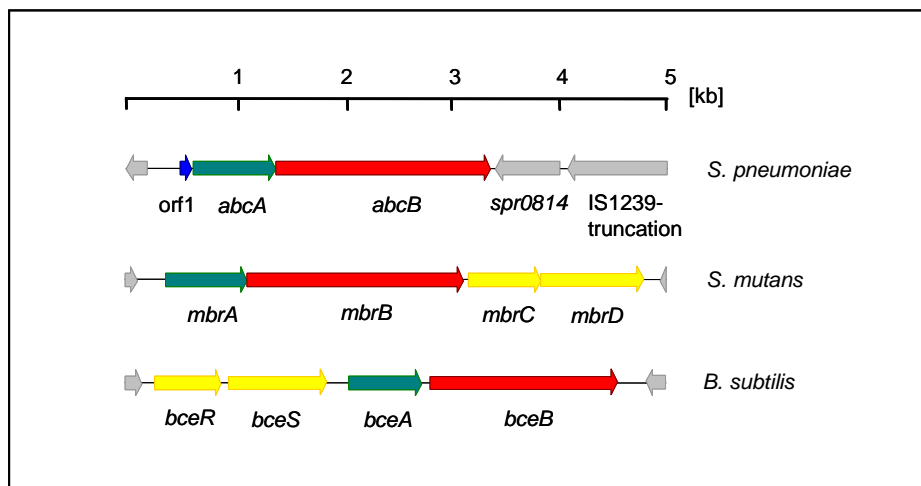
Referenzstammes R6 etwa sechsfach erhöht (siehe Abb. 3. 44). Durch qRT-PCR konnte somit kein Unterschied der Transkriptmengen zwischen *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 nachgewiesen werden. Die verschiedenen Transkriptmengenunterschiede, die in den Transkriptomstudien bzw. qRT-PCR auftraten, kamen vermutlich durch die Lage der zur Detektion der Transkripte verwendeten Oligonukleotide zustande. Im Mikroarrayexperiment lagen die Oligonukleotide an den 3'-Enden der jeweiligen Gene im Gegensatz zu den Oligonukleotiden, die in der qRT-PCR verwendet wurden, die an den 5'-Enden der Gene ein Produkt bildeten. Möglicherweise war das 3'-Ende der *abcAB*-mRNA degradiert, so dass diese nicht vollständig in cDNA umgeschrieben werden konnte.

Außerdem wurden die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Transformante gTR durch qRT-PCR mit den entsprechenden Transkriptmengen des Referenzstammes R6 verglichen. Dabei stellte sich ebenfalls heraus, dass die Transkripte beider Gene in der Transformante gTR etwa sechsfach höher vorlagen als im Referenzstamm R6 (siehe Abb. 3. 45). Es wurden keine Transkriptmengenunterschiede der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR detektiert. Aus diesem Ergebnis wurde abgeleitet, dass die erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR durch die Punktmutation im Gen *abcB* verursacht worden sind.

Die Ursache der erhöhten Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR wurde mit Hilfe von Promotoraktivitätsstudien analysiert (siehe 3.3.2.3.5, Abb. 3. 48). Es zeigte sich, dass die Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  weder in der Mutante gR6 noch in der Transformante gTR verglichen mit der Aktivität des Promotors im Referenzstamm R6 gesteigert war. Aus diesem Resultat leitete sich ab, dass die erhöhte Transkriptmenge der Gene *abcA* und *abcB* nicht durch eine gesteigerte Promotoraktivität verursacht worden war.

Durch Transkriptomanalysen und qRT-PCR werden Transkriptmengenunterschiede detektiert. Die Transkriptmenge hängt dabei von der Aktivität des Promotors oder von der Stabilität des Transkriptes oder von beiden ab. Da eine erhöhte Aktivität des Promotors  $P_{abc}$  in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR im Vergleich zum Referenzstamm R6 ausgeschlossen worden ist, können die erhöhten Transkriptmengen nur durch eine erhöhte Stabilität der Transkripte bedingt sein. Da sich die Mutante gR6 und die Transformante gTR nur durch die Punktmutation im Gen *abcB* von dem Referenzstamm R6 unterscheiden, können die erhöhten Transkriptmengen nur durch die Nonsensemutation am 3'-Ende des Genes *abcB* verursacht sein. Möglicherweise kommt es aufgrund der Punktmutation zur Ausbildung einer veränderten Sekundärstruktur im Vergleich zur ursprünglichen mRNA, die den Abbau durch RNasen hemmt.

Die Regulation des Operons ist bisher unbekannt. Möglicherweise gibt es ein Regulationssystem, das die Expression der Gene des ABC-Transporters reguliert, wie es bei den entsprechenden Genen homologer ABC-Transporter der Fall ist (Gauntlett *et al.*, 2008). In *S. mutans* beispielsweise wird die Expression der Gene *mbrAB* durch das TCS MbrCD reguliert, dessen codierende Gene *mbrCD* sich stromabwärts der Gene *mbrAB* befinden (Abb. 4. 4; Tsuda *et al.*, 2002). In *Bacillus subtilis* werden die Gene *bceAB*, die für den ABC-Transporter BceAB codieren, durch das TCS BceRS reguliert, dessen codierende Gene *bceRS* stromaufwärts der Gene *bceAB* liegen (Abb. 4. 4; Ohki *et al.*, 2003). Stimuli der TCS stellen Bacitracin und möglicherweise der native ABC-Transporter selbst dar (Bernard *et al.*, 2007; siehe Abb. 4. 7). Allerdings wurde dies nicht experimentell für den ABC-Transporter MbrAB gezeigt (Tsuda *et al.*, 2002). In Abb. 4. 4 wird die Genanordnung der hier verglichenen ABC-Transporter-Operons, *orf1-abcAB*, *mbrABCD* und *bceABRS*, aufgeführt.



**Abb. 4. 4: Genanordnung der Operons *orf1-abcAB* (*S. pneumoniae*), *mbrABCD* (*S. mutans*) und *bceABRS* (*B. subtilis*)**

Die Gene, die für ein ATP-Bindeprotein codieren, sind grün dargestellt, die Gene, die für die Permease-UE codieren, rot. Die für den ABC-Transporter MbrAB codierenden Gene *mbrAB* und die für den ABC-Transporter BceAB codierenden Gene *bceAB* werden durch die TCS MbrCD bzw. BceSR reguliert, die durch *mbrCD* und *bceSR* codiert werden (gelb). Das Gen *orf1*, das für ein Oligopeptid codiert, ist blau gekennzeichnet.

In *Enterococcus faecalis* ist ein weiterer ABC-Transporter, BcrABD, bekannt, der an der Resistenz gegen Bacitracin beteiligt ist. Die Expression des Operons *bcrABD* wird durch das membrangebundene DNA-Bindeprotein BcrR reguliert, dessen codierendes Gen stromaufwärts des Operons *bcrABD* liegt (Manson *et al.*, 2004; Gauntlett *et al.*, 2008). Der ABC-Transporter gehört gemäß des TC-Systems zur Familie 3.A.1.131 (Bacitracin Resistance (Bcr) Family) und zeigt auf Proteinebene keine Homologie zu dem ABC-Transporter Orf1-AbcAB.



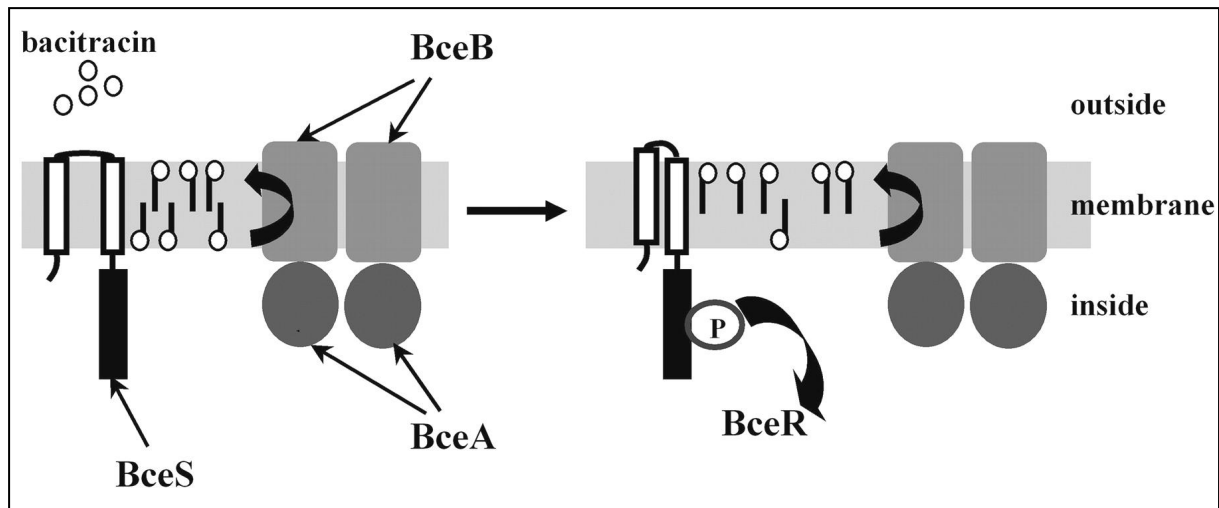


### 4.2.3 Mögliche Eigenschaften des ABC-Transporters Orf1-AbcAB

Nachdem nun die einzelnen Ergebnisse im Hinblick auf das ABC-Transporter-Operon *orf1-abcAB* diskutiert worden sind (siehe 4.2.2.3), werden im Folgenden verschiedene Modelle aufgezeigt, inwiefern der ABC-Transporter Orf1-AbcAB an der erhöhten Resistenz gegen Vancoresmycin und an der erhöhten Sensitivität gegen Bacitracin beteiligt sein könnte.

Tsuda *et al.* (2002) diskutieren, ob ein Substrat durch den ABC-Transporter MbrAB exportiert wird, das Bacitracin neutralisiert. Er selbst widerlegt diese These, indem er den Überstand einer *S. mutans* Kultur auf eine entsprechende Aktivität untersuchte und diese nicht nachweisen konnte. Dennoch wäre es vorstellbar, dass ein Substrat exportiert wird, das nicht Bacitracin neutralisiert, sondern Vancoresmycin aktiviert. Das Substrat würde aber nur exportiert werden, wenn die Permease in seiner ursprünglichen Form vorliegen würde. Nach dem Export aktiviert das Substrat Vancoresmycin, so dass das nun wirksame Vancoresmycin die Zellen zur Lyse bringt. Sobald die Permease verkürzt vorliegt, könnte das Substrat, das Vancoresmycin extrazellulär aktiviert, nicht mehr nach draußen transportiert werden und es kommt zu einer erhöhten Resistenz, wie es in der Mutante gR6 und in der Transformante gTR der Fall ist.

Bernard *et al.* (2007) schlagen für den ABC-Transporter BceAB in *Bacillus subtilis* einen Transportmechanismus vor, der als mögliches Substrat den UPP-BT-Komplex (Undecaprenylpyrophosphat-Bacitracin, UPP-BT) exportiert und der durch das TCS BceRS reguliert wird (Abb. 4. 7): Bacitracin bindet an das UPP, das zur Bildung des Komplexes UPP-BT führt. Unter der Annahme, dass dieser Komplex frei von der äußeren zur inneren Seite diffundiert, und umgekehrt, sind die Komplexe gleichmäßig auf beiden Seiten der Phospholipiddoppelschicht verteilt (Abb. 4. 7 links). Wenn der ABC-Transporter nun diesen UPP-BT-Komplex von der inneren Seite auf die äußere Seite exportiert, kommt es zu einer asymmetrischen Verteilung der UPP-BT-Komplexe (Abb. 4. 7 rechts). Aufgrund dieser ungleichen Verteilung, kommt es zu einer Positionsänderung der zwei Transmembrandomänen der Histidinkinase BceS, die zu einer Autophosphorylierung ihrer Transmitterdomäne führt. Daraufhin wird der Responseregulator BceR aktiviert, der eine verstärkte Expression der Gene *bceAB* bewirkt, die für den ABC-Transporter BceAB codieren. Gleichzeitig bedeutet dies, dass *bceAB* in geringen Mengen exprimiert werden muss, um die Asymmetrie der UPP-BT-Komplexe zu gewährleisten, die zu einer Aktivierung der Gene *bceAB* führt, ausgelöst durch BceRS. Weiterhin diskutieren sie, dass unter Berücksichtigung der schwachen Bindungskonstante ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ , Storm & Strominger, 1974) für die Interaktion von BT und UPP, bestimmte Mengen BT in das externe Medium freigesetzt würden, wodurch letztendlich BT aus der bakteriellen Membran verschwinden würde, und die Zellen vor dessen antibiotischen Wirkung geschützt würden.

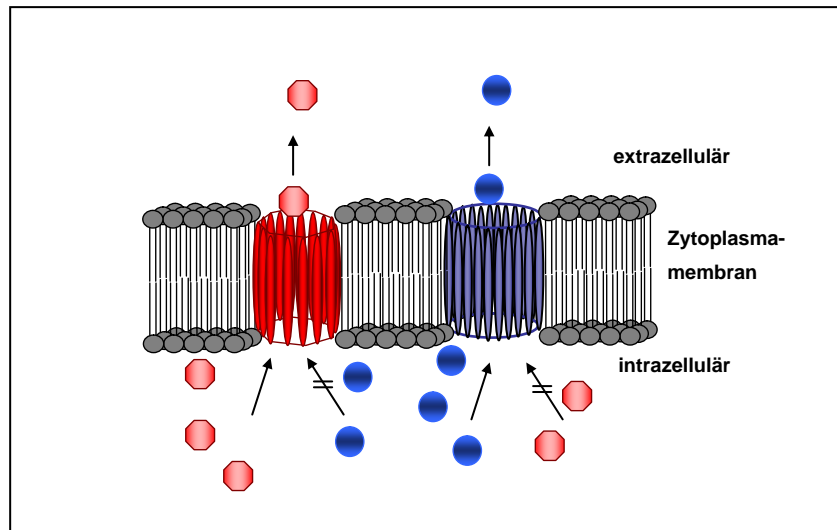


**Abb. 4. 7: Modell: Transportmechanismus des ABC-Transporters BceAB in *Bacillus subtilis***

BT (weiße Kreise) bildet mit UPP (schwarze Striche) die Komplexe UPP-BT (Kreise auf Striche). Die Transmembrandomänen der Histidinkinase BceS sind durch weiße Rechtecke wiedergegeben; die Transmitterdomäne von BceS durch ein schwarzes Rechteck. (Abb. aus Bernard *et al.*, 2007).

Unter Annahme des eben beschriebenen Modells und unter Einbeziehung der bestimmten MHK-Werte für Vancoresmycin und Bacitracin der verschiedenen Stämme, lassen sich folgende Thesen auf den ABC-Transporter Orf1-AbcAB ableiten: Vancoresmycin bildet ebenfalls mit UPP einen Komplex, der aber nur transportiert wird, wenn die Permease verkürzt ist, wie es in der Mutante gR6 und gTR der Fall ist. Wenn der ABC-Transporter Orf1-AbcAB in seiner ursprünglichen Form vorliegt (Referenzstamm R6) bzw. nicht vorhanden ist (R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC), können keine UPP-Vancoresmycinkomplexe transportiert werden. Der Komplex BT-UPP hingegen wird nur transportiert, wenn der ABC-Transporter unverändert vorliegt (Referenzstamm R6). Sobald der ABC-Transporter verkürzt (gR6, gTR) bzw. deletiert ist (R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC), findet kein Export mehr statt. Die Regulation des ABC-Transporter-Operons *orf-abcAB* allerdings bleibt ungeklärt, da bisher kein TCS bzw. kein Regulationsprotein ermittelt worden ist.

Ebenso kann die These aufgestellt werden, dass Vancoresmycin und Bacitracin selbst die Substrate des ABC-Transporters Orf1-AbcAB darstellen (Abb. 4. 8). Dabei wird Vancoresmycin nur exportiert, wenn die Permease verkürzt vorliegt, wodurch die Spezifität des ABC-Transporters verändert ist. Da die MHK-Werte des Referenzstammes R6 und der Deletionsstämme sich nicht für Vancoresmycin unterscheiden, kann abgeleitet werden, dass der unveränderte ABC-Transporter kein Vancoresmycin transportiert. Im Gegensatz dazu wurde spekuliert, dass Bacitracin transportiert wird, da die MHK des Referenzstammes R6 im Vergleich zu den anderen Stämmen erhöht ist. Sobald die Permease verkürzt bzw. deletiert ist, wird kein Bacitracin mehr transportiert, was sich in den MHK-Werten der Mutante gR6, der Transformante und den Deletionsstämmen für Bacitracin widerspiegelt.



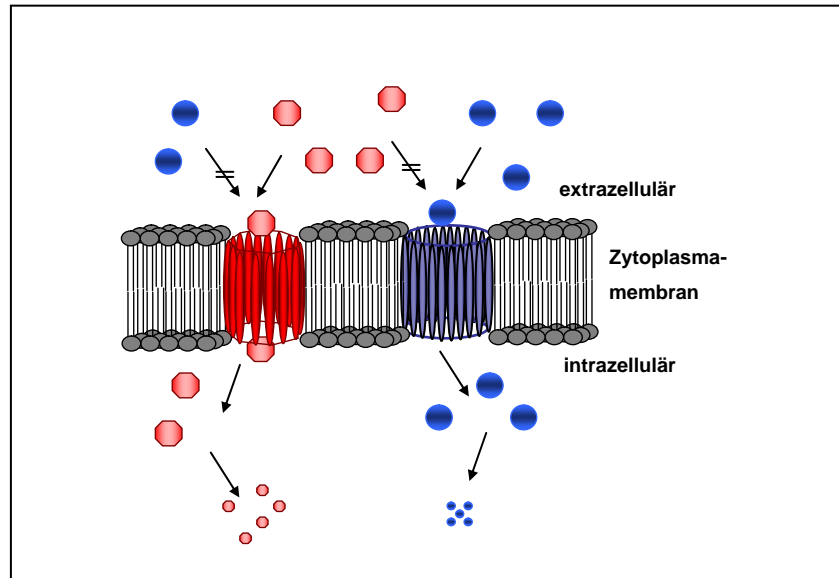
**Abb. 4. 8: Modell: Orf1-AbcAB als Exporter**

Vancoresmycin (rote Achtecke) wird mit Hilfe des verkürzten ABC-Transporters Orf1-AbcAB (rot; links) exportiert. Es kann aber nicht durch den unverändert vorliegenden ABC-Transporter (blau; rechts) nach draußen transportiert werden. Bacitracin (blaue Kreise) wird nur durch den unveränderten ABC-Transporter exportiert, nicht aber durch den verkürzten ABC-Transporter.

Im TC-System wurde der ABC-Transporter Orf1-AbcAB der Pep4E-Familie (3.A.1.123) zugeordnet, die sich durch den Export von Peptiden charakterisiert. Obwohl Orf1-AbcAB einer Exporterfamilie zugeordnet wurde, könnte es sich bei Orf1-AbcAB durchaus auch um einen Importer handeln. Der Export von Bacitracin wurde nämlich weder bei dem ABC-Transporter MbrAB noch bei BceAB experimentell nachgewiesen, so dass die genaue Funktionsweise der ABC-Transporter nach wie vor ungeklärt ist (Bernard *et al.*, 2007). Bei Orf1-AbcAB könnte es sich um einen Importer handeln, da der strukturelle Aufbau des ABC-Transporters möglicherweise dafür spricht: Zum einen setzt sich eine Permease-UE aus zehn TMH statt der für Exporter allgemein üblichen sechs TMH zusammen. Zum anderen werden die Genprodukte getrennt voneinander synthetisiert im Gegensatz zu bekannten Exportern, deren ATPase- und Permeasedomänen in einer Polypeptidkette synthetisiert werden. Allerdings spricht das nicht vorhandene SBP und das nicht identifizierte EAA-Motiv (Dassa & Hofnung, 1985; Saurin & Dassa, 1994), das für Importer charakteristisch ist, dagegen.

Das identifizierte Oligopeptid, codiert durch *orf1*, ist vermutlich kein SBP, da SBP in der Regel eine Größe von mehr als 100 AS aufweisen. Möglicherweise handelt es sich bei dem Oligopeptid um einen akzessorischen Faktor, der eine regulatorische oder katalytische Rolle spielt (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).





**Abb. 4. 9: Modell: Orf1-AbcAB als Importer**

Vancoresmycin (rote Achtecke) wird in die Zelle durch den verkürzten ABC-Transporter Orf1-AbcAB (rot; links) transportiert, und intrazellulär metabolisiert, im Gegensatz dazu wird Bacitracin (blaue Kreise) nicht importiert. Der unveränderte ABC-Transporter (blau; rechts) importiert Bacitracin, aber nicht Vancoresmycin. Bacitracin wird intrazellulär verstoffwechselt.

Unter der Annahme, dass es sich bei dem ABC-Transporter Orf1-AbcAB um einen Importer handelt, könnte folgendes Modell abgeleitet werden (Abb. 4. 9): Vancoresmycin wird durch den verkürzten ABC-Transporter Orf1-AbcAB importiert und intrazellulär metabolisiert. Dadurch gelangt Vancoresmycin nicht bzw. in geringerem Maße an seine zelluläre Zielstruktur mit der Folge, dass das Wachstum nicht bzw. weniger gehemmt wird. Der unveränderte ABC-Transporter ist nicht in der Lage Vancoresmycin zu transportieren, so dass es nicht in der Zelle verstoffwechselt wird und es das Wachstum inhibieren kann. Im Gegensatz dazu wird Bacitracin durch den regulären ABC-Transporter importiert und intrazellulär metabolisiert, so dass das Wachstum nicht eingeschränkt wird, wie es sich in der MHK des Referenzstammes R6 für Bacitracin widerspiegelt. Wenn der ABC-Transporter Orf1-AbcAB verkürzt bzw. deletiert ist, findet kein Import von Bacitracin statt, was durch die erhöhte Sensitivität der Stämme gR6, gTR, R6 $\Delta$ ABC, gR6 $\Delta$ ABC und gTR $\Delta$ ABC für Bacitracin repräsentiert wird.

### 4.3 Ausblick

Um die zelluläre Zielstruktur des Antibiotikums Vancoresmycin aufzuklären und um weitere Resistenzdeterminanten zu identifizieren, können Genbanken von den bisher nicht untersuchten Mutanten bR6, cR6, dR6, eR6, fR6 und hR6 angelegt und gescreent werden. Dabei sollte in Erwägung gezogen werden, dass die Genbanken in einem anderen Wirtssystem als *E. coli* wie z. B. *Lactococcus lactis* und unter Verwendung des Vektors pG<sup>+</sup>host9 etabliert werden. (Biswas *et al.*, 1993). Da es sich bei *L. lactis* um einen grampositiven Organismus handelt, der mit *S. pneumoniae* wesentlich näher verwandt ist als *E. coli*, würde umgangen werden, dass einige Gene von grampositiven Organismen in *E. coli* nicht klonierbar sind (Sorek *et al.*, 2007). Möglicherweise könnte dadurch auch die Resistenzdeterminante der Mutante aR6 ermittelt werden.

Des Weiteren können die Mutanten bR6, cR6, dR6 und hR6 durch Transkriptomanalysen mit dem Referenzstamm R6 im Hinblick auf Transkriptmengenunterschiede untersucht werden, die auf die zelluläre Zielstruktur bzw. auf weitere Resistenzdeterminanten schließen lassen. Da in dieser Arbeit ein Biochip verwendet wurde, dessen Oligonukleotide ausschließlich am 3'-Ende der Gene hybridisieren, könnte ein neu entwickelter Biochip benutzt werden, dessen Oligonukleotide am 5'-Ende der Gene hybridisieren. Dadurch würde vermieden werden, dass Transkripte, die möglicherweise am 3'-Ende degradiert worden sind, in den Transkriptomanalysen nicht auftauchen. Mit Hilfe dieses neuen Biochips könnten die Mutanten aR6, eR6 und fR6 erneut überprüft werden.

Alle Mutanten könnten im Vergleich zum Referenzstamm R6 im Hinblick auf andere Antibiotikaresistenzen analysiert werden. Eine MHK-Bestimmung für Nisin und Vancomycin könnte die These untermauern, dass Vancoresmycin an Zellwandstrukturen interagiert. Wenn es Mutanten gibt, die gegen ein getestetes Antibiotikum ebenfalls resistenter sind als der Referenzstamm R6, so könnten bekannte Wirkungsmechanismen bzw. zelluläre Targets übertragen werden, was möglicherweise einen Hinweis auf das zelluläre Target von Vancoresmycin gibt. Dieses Target könnte dann detailliert untersucht werden.

Das ABC-Transporter-Operon *orf1-abcAB* könnte im Hinblick auf seine Regulation weiter analysiert werden. Beispielsweise könnte durch Deletion des TCS01 im Referenzstamm R6 und in der Mutante gR6 und anschließender MHK-Bestimmung für Vancoresmycin und Bacitracin eine mögliche Abhängigkeit der Gene, die für den ABC-Transporter codieren, von TCS01 gezeigt werden. Des Weiteren können Promotoraktivitätsstudien nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Vancoresmycin und Bacitracin Aufschluss geben, ob die Aktivität des Promotors P<sub>abc</sub> dadurch gesteigert werden kann. In diesem Zusammenhang könnte auch getestet werden, ob nach Zugabe verschiedener Konzentrationen

Vancoresmycin und Bacitracin, die Transkriptmengen der Gene *abcA* und *abcB* weiter zunehmen.

Ebenso sollte überprüft werden, ob die Mutante gR6 und die Transformante gTR gegenüber anderer Peptidantibiotika resistenter oder sensitiver sind als der Referenzstamm R6.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aduse-Opoku J., Tao L., Ferretti J. J. & Russell R. R.** (1991): Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* alpha-galactosidase. *J. Gen. Microbiol.* **137 (4)**: 757-764
- Agaisse H., Gominet M., Okstad O. A., Kolstø A. B. & Lereclus D.** (1999): PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **32 (5)**: 1043-1053
- Albers S.-V., Elferink M. G. L., Charlebois R. L., Sensen C. W., Driessen A. J. M. & Konings W. N.** (1999): Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *J. Bacteriol.* **181 (14)**: 4285-4291
- Alekshun M. N. & Levy S. B.** (2007): Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128 (6)**: 1037-1050
- Allison J. L., Hartman R. E., Hartman R. S., Wolfe A. D., Ciak J. & Hahn F.E.** (1962): MODE OF ACTION OF CHLORAMPHENICOL VII. Growth and Multiplication of *Escherichia coli* in the Presence of Chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **83 (3)**: 609–615
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A, Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D. J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25 (17)**: 3389-3402
- Amann R. I., Ludwig W. & Schleifer K.H.** (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59 (1)**: 143-69
- Ambudkar S. V., Kim I. W., Xia D. & Sauna Z. E.** (2006): The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.* **580 (4)**: 1049-1055
- Avery O. T., MacLeod M. D. & McCarty M.** (1944): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* **79**:137-158
- Barber M.** (1947): Staphylococci infection due to penicillin-resistant strains. *BMJ* **2**: 863-865
- Barré O., Mourlane F. & Solioz M.** (2007): Copper induction of lactate oxidase of *Lactococcus lactis*: a novel metal stress response. *J. Bacteriol.* **189 (16)**: 5947-5954
- Bax R., Mullan N. & Verhoef J.** (2000): The millennium bugs--the need for and development of new antibacterials. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16 (1)**: 51-59
- Beck E. & Bremer E.** (1980): Nucleotide sequence of the gene *ompA* coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **8 (13)**: 3011-3027

- Bensing B. A., Meyer B. J. & Dunny G. M.** (1996): Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (15): 7794-7799
- Bentley S. D., Aanensen D. M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., Donohoe K., Harris D., Murphy L., Quail M. A., Samuel G., Skovsted I. C., Kalltoft M. S., Barrell B., Reeves P. R., Parkhill J. & Spratt B. G.** (2006): Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* **2** (3): e31
- Bergé M., Mortier-Barrière I., Martin B. & Claverys J. P.** (2003): Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Mol. Microbiol.* **50** (2): 527-536
- Bergmann E. D. & Sicher S.** (1952): Mode of action of chloramphenicol. *Nature* **170** (4335): 931-932
- Bernard R., Guiseppi A., Chippaux M., Foglino M. & Denizot F.** (2007): Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J. Bacteriol.* **189** (23): 8636-8642
- Bernard R., Joseph P., Guiseppi A., Chippaux M. & Denizot F.** (2003): YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **228** (1): 93-97
- Biemans-Oldehinkel E., Doeven M. K. & Poolman B.** (2006): ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **580** (4): 1023-1035
- Birnboim H. C. & Doly J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523
- Biswas I., Gruss A., Ehrlich S. D. & Maguin E.** (1993): High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **175** (11): 3628-3635
- Bochner B. R., Huang H. C., Schieven G. L. & Ames B. N.** (1980): Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* **143** (2): 926-933
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L. & Boyer H. W.** (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene* **2** (2): 95-113
- Borysowski J., Weber-Dabrowska B. & Górski A.** (2006): Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **231** (4): 366-377
- Bradford 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

- Brisson-Noël A., Trieu-Cuot P. & Courvalin P.** (1988): Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* **22** (Suppl. B): 13-23
- Brodersen D. E., Clemons W. M. Jr., Carter A. P., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. & Ramakrishnan V.** (2000): The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103** (7): 1143-1154
- Brooks-Walter A., Tart R. C., Briles D. E. & Hollingshead S. K.** (1997): The *pspC* gene encodes a second pneumococcal surface protein homologous to the gene encoding the protection-eliciting PspA protein of *Streptococcus pneumoniae*. Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology 1997.
- Brown J. H.** (1919): The use of blood agar for the study of *streptococci*. *Monograph No. 9*. The Rockefeller Institute for Medical Research, New York
- Brown M. R., Allison D. G. & Gilbert P.** (1988): Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* **22** (6): 777-780
- Cáceres N. E., Harris N. B., Wellehan J. F., Feng Z., Kapur V. & Barletta R. G.** (1997): Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **179** (16): 5046-5055
- Cadieux N., Bradbeer C., Reeger-Schneider E., Köster W., Mohanty A. K., Wiener M. C. & Kadner R. J.** (2002): Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184** (3): 706-717
- Campbell E. A., Choi S. Y. & Masure H. R.** (1998): A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol. Microbiol.* **27** (5): 929-939
- Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. & Ramakrishnan V.** (2000): Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407** (6802): 340-348
- Chalmers R., Sewitz S., Lipkow K. & Crellin P.** (2000): Complete nucleotide sequence of Tn10. *J. Bacteriol.* **182** (10): 2970-2972
- Chang X. B.** (2007): A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev.* **26** (1): 15-37
- Chen J. D. & Morrison D. A.** (1987): Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **133** (7): 1959-1967
- Chen J., Sharma S., Quiocho F. A. & Davidson A. L.** (2001): Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (4): 1525-1530

- Chen R. & Wittmann-Liebold B.** (1975): The primary structure of protein S9 from the 30S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett.* **52 (1)**: 139-134
- Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M. & Hakenbeck R.** (2007): Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297 (7-8)**: 503-512
- Chopra I., Hawkey P. M. & Hinton M.** (1992): Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29 (3)**: 245-277
- Chow J. W., Thal L. A., Perri M. B., Vazquez J. A., Donabedian S. M., Clewell D. B. & Zervos M. J.** (1993): Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37 (11)**: 2474-2477
- Claverie-Martin F., Diaz-Torres M. R., Yancey S. D. & Kushner S. R.** (1989): Cloning of the altered mRNA stability (*ams*) gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **171 (10)**: 5479-5486
- Coates A. R. M. & Hu Y.** (2007): Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br. J. Pharmacol.* **152 (8)**: 1147-1154
- Cobine P., Wickramasinghe W. A., Harrison M. D., Weber T., Solioz M. & Dameron C. T.** (1999): The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper (I) to the CopY repressor. *FEBS Lett.* **445 (1)**: 27-30
- Coburn P. S., Hancock L. E., Booth M. C. & Gilmore M. S.** (1999): A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Infect. Immun.* **67 (7)**: 3339-3347
- Colby S. M., Whiting G. C., Tao L. & Russell R. R.** (1995): Insertional inactivation of the *Streptococcus mutans dexA* (dextransase) gene results in altered adherence and dextran catabolism. *Microbiology* **141 (Pt 11)**: 2929-2936
- Costerton J. W., Stewart P. S. & Greenberg E.P.** (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284 (5418)**: 1318-1322
- Dabbs E. R.** (1978): Kasugamycin-dependent mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **136 (3)**: 994-1001
- Dabbs E. R.** (1983): *Escherichia coli* kasugamycin dependence arising from mutation at the *rpsL* locus. *J. Bacteriol.* **153 (2)**: 709-715
- Daniel R.** (2004): The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15 (3)**: 199-204

- Dassa E. & Hofnung M.** (1985): Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* **4** (9): 2287-2293
- Davidson A. L.** (2002): Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.* **184** (5): 1225-1233.
- Davidson A. L. & Chen J.** (2004): ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 241-268
- Davidson A. L., Shuman H. A. & Nikaido H.** (1992): Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (6): 2360-2364
- Davies J.** (1965): Effects of streptomycin and related antibiotics on protein synthesis. *Antimicrobial Agents Chemother. (Bethesda)* **5**: 1001-1005
- Davies J.** (1996): Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia*. **12** (1): 9-16
- Davies J. & Davis B. D.** (1968): Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J. Biol. Chem.* **243** (12): 3312-3316
- Davies J. & Wright G. D.** (1997): Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* **5** (6): 234-240
- Dawson R. J., Hollenstein K. & Locher K. P.** (2007): Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol. Microbiol.* **65** (2): 250-257
- Dawson R. J. & Locher K. P.** (2006): Structure of a bacterial multidrug ABC Transporter. *Nature* **443** (7108): 180-185
- Dawson R. J. & Locher K. P.** (2007): Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett.* **581** (5): 935-938
- Desai B. V. & Morrison D. A.** (2006): An unstable competence-induced protein, *CoiA*, promotes processing of donor DNA after uptake during genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **188** (14): 5177-5186
- de Saizieu A., Gardès C., Flint N., Wagner C., Kamber M., Mitchell T. J., Keck W., Amrein K. E. & Lange R.** (2000): Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.* **182** (17): 4696-4703
- Devine S. E., Ling V. & Melera P. W.** (1992): Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (10): 4564-4568



- Dillard J. P. & Yother J.** (1991): Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequences cloned into *Escherichia coli*: effect of promoter strength and transcription terminators. *J. Bacteriol.* **173 (16)**: 5105-5109
- Dintilhac A., Alloing G., Granadel C. & Claverys J. P.** (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 (4)**: 727-739
- Dirix G., Monsieurs P., Marchal K., Vanderleyden J. & Michiels J.** (2004): Screening genomes of Gram-positive bacteria for double-glycine-motif-containing peptides. *Microbiology* **150 (Pt 5)**: 1121-1126
- Dower W. J., Miller J. F. & Ragsdale C. W.** (1988): High efficiency of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16 (13)**: 6127-6145
- Dowson C. G., Hutchison A., Woodford N., Johnson A. P., George R. C. & Spratt B.G.** (1990): Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87 (15)**: 5858-5862
- Doyle M. P. & Erickson M. C.** (2006): Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult. Sci.* **85 (6)**: 960-973
- Dubnau D.** (1999): DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 217-244
- Fath M. J. & Kolter R.** (1993): ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57 (4)**: 995-1017
- Felgenhauer B. & Trautner K.** (1982): A comparative study of extracellular glucanhydrolase and glucosyltransferase enzyme activities of five different serotypes of oral *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral. Biol.* **27 (6)**: 455-461
- Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., et al.** (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269 (5223)**: 496-512
- Fleming A.** (1929): Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10: 226-236 *Rev. Infect. Dis.* 1980 **2 (1)**: 129-139
- Gänzle M. G., Höltzel A., Walter J., Jung G. & Hammes W. P.** (2000): Characterization of Reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* **66 (10)**: 4325-4333
- García P., García J. L., García E. & López R.** (1986): Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43 (3)**: 265-272.

- Gauntlett J. C., Gebhard S., Keis S., Manson J. M., Pos K. M. & Cook G. M.** (2008): Molecular analysis of BcrR: A membrane-bound bacitracin sensor and DNA-binding protein from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **283** (13): 8591-8600
- Gillespie D. E., Brady S. F., Bettermann A. D., Cianciotto N. P., Liles M. R., Rondon M. R., Clardy J., Goodman R.M. & Handelsman J.** (2002): Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (9): 4301-4306
- Gilmore M. S., Segarra R. A. & Booth M. C.** (1990): An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect. Immun.* **58** (12): 3914-3923
- Gilmore M. S., Segarra R. A., Booth M. C., Bogie C. P., Hall L. R. & Clewell D. B.** (1994): Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176** (23): 7335-7344
- Gilson E., Alloing G., Schmidt T., Claverys J. P., Dudler R. & Hofnung M.** (1988): Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *EMBO J.* **7** (12): 3971-3974
- Gominet M., Slamti L., Gilois N., Rose M. & Lereclus D.** (2001): Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence. *Mol. Microbiol.* **40** (4): 963-975
- Grebe T. & Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** (4): 829-834
- Grebe T., Paik J. & Hakenbeck R.** (1997): A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J. Bacteriol.* **179** (10): 3342-3349
- Grebe T. W. & Stock J. B.** (1999): The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**: 139-227
- Haas W., Kaushal D., Sublett J., Obert C. & Tuomanen E.** (2005): Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **187** (23): 8205-8210
- Haas W., Shepard B. D. & Gilmore M. S.** (2002): Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* **415** (6867): 84-87
- Hakenbeck R., Grebe T., Zähler D. & Stock J. B.** (1999): beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33** (4): 673-678

- Halfmann A., Hakenbeck R. & Brückner R.** (2007a): A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **268 (2)**: 217-224
- Halfmann A., Kovács M., Hakenbeck R. & Brückner R.** (2007b): Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol. Microbiol.* **66 (1)**: 110-126
- Halling S. M., Simons R. W., Way J. C., Walsh R. B. & Kleckner N.** (1982): DNA sequence organization of IS10-right of Tn10 and comparison with IS10-left. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79 (8)**: 2608-2612
- Hamada S. & Slade H. D.** (1980): Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44 (2)**: 331-384
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166 (4)**: 557-580
- Hansen F. G. & von Meyenburg K.** (1979): Characterization of the *dnaA*, *gyrB* and other genes in the *dnaA* region of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages lambda tna. *Mol. Gen. Genet.* **175 (2)**: 135-144
- Hansman D. & Bullen M. M.** (1967): A resistant pneumococcus. *Lancet* ii: 264-265
- Hansman D., Devitt L., Miles H. & Riley I.** (1974): Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med. J. Aust.* **2 (10)**: 353-356
- Hardie J. M. & Whiley R. A.** (1995): The genus *Streptococcus*. In *The genera of lactic acid bacteria* (Hrsg. Wood B. J. B. and Holtzapfel W. H.). Blackie Academic & Professional, Vol. 2: 55-124
- Hartmann G., Honikel K. O., Knüsel F. & Nüesch J.** (1967): The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta.* **145 (3)**: 843-844
- Håvarstein L. S., Coomaraswamy G. & Morrison D. A.** (1995): An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92 (24)**: 11140-11144
- Håvarstein L. S., Gaustad P., Nes I. F. & Morrison D. A.** (1996): Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.* **21 (4)**: 863-869
- Håvarstein L. S., Hakenbeck R. & Gaustad P.** (1997): Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that *streptococci* can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J. Bacteriol.* **179 (21)**: 6589-94

- Håvarstein L. S., Holo H. & Nes I. F.** (1994): The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* **140 (Pt 9)**: 2383-2389
- Heintz M.** (2006): Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen, Dissertation, TU Kaiserslautern
- Henrich B., Lubitz W. & Plapp R.** (1983): Expression of  $\phi$ X174 lysis gene cloned into different plasmids. The target of penicillin, Walter de Gruyter & Co., Berlin New York: 197-203
- Henrich B. & Schmidtberger B.** (1995): Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of phi X174 phage gene E. *Gene* **154 (1)**: 51-54
- Higgins C. F.** (1993): The multidrug resistance P-glycoprotein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5 (4)**: 684-687
- Higgins C. F.** (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 67-113
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S. & Griffith R.** (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10 (4)**: 413-417
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. & Watson R.** (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11 (9)**: 1026-1030
- Hill F., Gemünd C., Benes V., Ansorge W. & Gibson T. J.** (2000): An estimate of large-scale sequencing accuracy. *EMBO reports* **1 (1)**: 29-31
- Hoang L., Fredrick K. & Noller H. F.** (2004): Creating ribosomes with an all-RNA 30S subunit P site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101 (34)**: 12439-12443
- Hollenstein K, Frei D. C. & Locher K. P.** (2007): Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446 (7132)**: 213-216
- Höltje J. V. & Tomasz A.** (1976): Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251 (14)**: 4199-4207
- Hopmann C., Kurz M., Bronstrup M., Wink J. & LeBeller D.** (2002): Isolation and structure elucidation of vancoresmycin-a new antibiotic from *Amycolatopsis* sp. ST 101170. *Tetrahedron Letters* **43**: 435-438
- Horlacher R. & Boos W.** (1997): Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *J. Biol. Chem.* **272 (20)**: 13026-13032
- Hoskins J., Alborn W. E. Jr., Arnold J., Blaszcak L. C., Burgett S., DeHoff B. S., Estrem S. T., Fritz L., Fu D. J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J. S., Khoja H., Kraft A. R., Lagace R. E., LeBlanc D. J., Lee L. N., Lefkowitz E. J., Lu J., Matsushima P., McAhren S. M., McHenney M.,**

- McLeaster K., Mundy C. W., Nicas T. I., Norris F. H., O'Gara M., Peery R. B., Robertson G. T., Rockey P., Sun P. M., Winkler M. E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C. A., Baltz R. H., Jaskunas S. R., Rosteck P. R. Jr., Skatrud P. L. & Glass J. I.** (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183 (19)**: 5709-5717
- Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C., Balog J. M. & Donoghue A. M.** (2003): Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis.* **47 (4)**: 1399-1405
- Hui F. M., Zhou L. & Morrison D. A.** (1995): Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcin A secretion genes. *Gene* **153 (1)**: 25-31
- Hutter B., Schaab C., Albrecht S., Borgmann M., Brunner N. A., Freiberg C., Ziegelbauer K., Rock C. O., Ivanov I. & Loferer H.** (2004): Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48 (8)**: 2838-2844
- Hvorup R. N., Goetz B. A., Niederer M., Hollenstein K., Perozo E. & Locher K. P.** (2007): Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* **317 (5843)**: 1387-1390
- Ike Y., Clewell D. B., Segarra R. A. & Gilmore M. S.** (1990): Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* **172 (1)**: 155-163
- Jacobs M. R., Koornhof H. J., Robins-Browne R. M., Stevenson C. M., Vermaak Z. A., Freiman I., Miller G. B., Witcomb M. A., Isaäcson M., Ward J. I. & Austrian R.** (1978): Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* **299 (14)**: 735-740
- Jacoby G. A. & Munoz-Price L. S.** (2005): The new beta-lactamases. *N. Engl. J. Med.* **352 (4)**: 380-391
- Jedrzejewski M. J.** (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65 (2)**: 187-207
- Jett B. D., Jensen H. G., Nordquist R. E. & Gilmore M. S.** (1992): Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* **60 (6)**: 2445-2452
- Kajiji S., Talbot F., Grizzuti K., Van Dyke-Phillips V., Agresti M., Safa A. R. & Gros P.** (1993): Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry* **32 (16)**: 4185-4194
- Kammermann T.** (2007): Forschungspraktikum

- Kawamura Y., Hou X. G., Sultana F., Miura H. & Ezaki T.** (1995): Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** (2): 406-408
- Khalikova E., Susi P. & Korpela T.** (2005): Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69** (2): 306-325
- Kislak J. W., Razavi L. M., Daly A. K. & Finland M.** (1965): Susceptibility of *pneumococci* to nine antibiotics. *Am. J. Med. Sci.* **250** (3): 261-268
- Kleckner N., Roth J. & Botstein D.**, (1977): Genetic engineering *in vivo* using translocatable drug-resistance elements. New methods in bacterial genetics. *J. Mol. Biol.* **116** (1): 125-129
- Köhler W.** (2007): The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297** (3): 133-150
- Lacks S. A. & Hotchkiss R. D.** 1960: A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* **39**: 508-517
- Lancefield R. C.** (1933): A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595
- Lanfermeijer F. C., Detmers F. J., Konings W. N. & Poolman B.** (2000): On the binding mechanism of the peptide receptor of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *EMBO J.* **19** (14): 3649-3656
- Lawrenson J. B., Klugman K. P., Eidelman J. I., Wasas A., Miller S. D. & Lipman J.** (1988): Fatal infection caused by a multiply resistant type 3 pneumococcus. *J. Clin. Microbiol.* **26** (8): 1590-1591
- LeBlanc D. J., Lee L. N. & Inamine J. M.** (1991): Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** (9): 1804-1810
- Lee M. S. & Morrison D. A.** (1999): Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* **181** (16): 5004-5016
- Lereclus D., Agaisse H., Gominet M., Salamitou S. & Sanchis V.** (1996): Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* **178** (10): 2749-2756
- Li X. Z. & Nikaido H.** (2004): Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64** (2): 159-204
- Locher K. P., Lee A. T. & Rees D. C.** (2002): The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296** (5570): 1091-1098

- Loiseau L., Ollagnier-de-Choudens S., Nachin L., Fontecave M. & Barras F.** (2003): Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* **278** (40): 38352-38359
- Loo T. W. & Clarke D. M.** (1994): Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein. *Biochemistry* **33** (47): 14049-14057
- Lüllmann H. & Mohr K.** (1999): Pharmakologie und Toxikologie 14. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Luo P. & Morrison D. A.** (2003): Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185** (1): 349-358
- Madigan M. T., Martinko J. M. & Parker J.** (2000): Brock: Mikrobiologie Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Maes M. & Messens E.** (1992): Phenol as grinding material in RNA preparation. *Nucl. Acid Res.* **20** (16): 4374
- Magnani D., Barré O., Gerber S. D. & Solioz M.** (2008): Characterization of the CopR regulon of *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* **190** (2): 536-545
- Maloy S. R. & Nunn W. D.** (1981): Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145** (2): 1110-1111
- Manson J. M., Keis S., Smith J. M. & Cook G. M.** (2004): Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (10): 3743-3748
- Marmur J.** (1961): A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 202-218
- Mavroidi A., Aanensen D. M., Godoy D., Skovsted I. C., Kalltoft M. S., Reeves P. R., Bentley S. D. & Spratt B.G.** (2007): Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J. Bacteriol.* **189** (21): 7841-7855
- Maxwell A.** (1997): DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5** (3): 102-109
- McMurry L., Petrucci R. E. Jr. & Levy S. B.** (1980): Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (7): 3974-3977

- Méjean V. & Claverys J. P.** (1988): Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **213 (2-3)**: 444-448
- Méjean V. & Claverys J. P.** (1993): DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **268 (8)**: 5594-5599
- Michael A. P., Grace E. J., Kotiw M. & Barrow R. A** (2002): Ravenic Acid, a new tetramic acid isolated from a cultured microfungus, *Penicillium* sp.. *J. Nat. Prod.* **65 (9)**: 1360–1362
- Miller J. H.** (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Press New York
- Mills S. D.** (2006): When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery? *Biochem. Pharmacol.* **71 (7)**: 1096-1102
- Morrison D. A. & Guild W. R.** (1973): Breakage prior to entry of donor DNA in Pneumococcus transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* **299 (4)**: 545-556
- Morrison D. A. & Lee M. S.** (2000): Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: a link between quorum sensing and DNA processing genes. *Res. Microbiol.* **151 (6)**: 445-451
- Morrison D. A. & Mannarelli B.** (1979): Transformation in pneumococcus: nuclease resistance of deoxyribonucleic acid in the eclipse complex. *J. Bacteriol.* **140 (2)**: 655-665
- Mortier-Barrière I., de Saizieu A., Claverys J. P. & Martin B.** (1998): Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **27 (1)**: 159-170
- Mortier-Barrière I., Velten M., Dupaigne P., Mirouze N., Piétrement O., McGovern S., Fichant G., Martin B., Noirot P., Le Cam E., Polard P. & Claverys J. P.** (2007): A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* **130 (5)**: 824-836
- Mufson M. A., Kruss D. M., Wasil R. E. & Metzger W. I.** (1974): Capsular types and outcome of bacteremic pneumococcal disease in the antibiotic era. *Arch. Intern. Med.* **134 (3)**: 505-510
- Müller H.-J.** (2001): PCR Polymerase-Kettenreaktion; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Murphy N. R. & Hellwig R. J.** (1996): Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier material. *Biotechniques* **21 (5)**: 934-936, 938-939
- Murray N. E.** (2000): Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64 (2)**: 412-434



- Murray N. E. & Kelley W. S.** (1979): Characterization of lambdapolA transducing phages; effective expression of the *E. coli* polA gene. *Mol. Gen. Genet.* **175 (1)**: 77-87
- Muscher D. M., Breiman R. F. & Tomasz A.** (2000): *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21st century. In *Streptococcus pneumoniae* (ed. A. Tomasz), Mary Ann Liebert, Larchmont, USA
- Nachin L., Loiseau L., Expert D. & Barras F.** (2003): SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **22 (3)**: 427-437
- Nakai T. & Park S. C.** (2002): Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.* **153 (1)**: 13-18
- Neu H. C. & Heppel L. A.** (1965): The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240 (9)**: 3685-3692
- Newman D. J. & Cragg G. M.** (2007): Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70 (3)**: 461-477
- Newton B. A.** (1956): The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol. Rev.* **20 (1)**: 14-27
- Noller H. F., Hoang L. & Fredrick K.** (2005): The 30S ribosomal P site: a function of 16S rRNA. *FEBS Lett.* **579 (4)**: 855-858
- Novak R., Cauwels A., Charpentier E. & Tuomanen E.** (1999): Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **181 (4)**: 1126-1133
- Obis D., Guillot A., Gripon J. C., Renault P., Bolotin A. & Mistou M. Y.** (1999): Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J. Bacteriol.* **181 (20)**: 6238-6246
- Odermatt A. & Solioz M.** (1995): Two *trans*-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **270 (9)**: 4349-4354
- Ohki R., Giyanto, Tateno K., Masuyama W., Moriya S., Kobayashi K. & Ogasawara N.** (2003): The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49 (4)**: 1135-1144
- Okstad O. A., Gominet M., Purnelle B., Rose M., Lereclus D. & Kolstø A. B.** (1999): Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology* **145 ( Pt 11)**: 3129-3138

- Ottolenghi, E. & Hotchkiss, R. D.** (1962): Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J. Exp. Med.* **116**: 491-519
- Outten F. W., Djaman O. & Storz G.** (2004): A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52 (3)**: 861-872
- Outten F. W., Wood M. J., Munoz F. M. & Storz G.** (2003): The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278 (46)**: 45713–45719
- Park I. H., Pritchard D. G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M. C. & Nahm M. H.** (2007): Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **45 (4)**: 1225-1233
- Pasteur L.** (1881): Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Méd (Paris)* **10**: 94-103
- Paterson G. K., Blue C. E. & Mitchell T. J.** (2006): Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* **55 (Pt 4)**: 355-363
- Patterson M. J.** (1996): Streptococcus. In *Medical Microbiology* (ed S. Baron), 4th ed, Churchill Livingstone, New York, USA
- Peschke U., Beuck V., Bujard H., Gentz R. & Le Grice S.** (1985): Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **186 (3)**: 547-555
- Pestova E. V., Håvarstein L. S. & Morrison D. A.** (1996): Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* **21 (4)**: 853-862
- Peterson S., Cline R. T., Tettelin H., Sharov V. & Morrison D. A.** (2000): Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* **182 (21)**: 6192-6202
- Peterson S. N., Sung C. K., Cline R., Desai B. V., Snesrud E. C., Luo P., Walling J., Li H., Mintz M., Tsegaye G., Burr P. C., Do Y., Ahn S., Gilbert J., Fleischmann R. D. & Morrison D. A.** (2004): Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol.* **51 (4)**: 1051-1070
- Pinkett H. W., Lee A. T., Lum P., Locher K. P. & Rees D. C.** (2007): An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315 (5810)**: 373-377
- Pleban K., Kopp S., Csaszar E., Peer M., Hrebicek T., Rizzi A., Ecker G. F. & Chiba P. U.** (2005): P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane

domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol. Pharmacol.* **67** (2): 365-374

**Podlesek Z., Comino A., Herzog-Velikonja B., Zgur-Bertok D., Komel R. & Grabnar M.** (1995): *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol. Microbiol.* **16** (5): 969-976

**Portmann R., Magnani D., Stoyanov J. V., Schmechel A., Multhaupt G. & Solioz M.** (2004): Interaction kinetics of the copper-responsive CopY repressor with the cop promoter of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9** (4): 396-402

**Quiocho F. A. & Ledvina P. S.** (1996): Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20** (1): 17-25

**Ravin A. W.** (1959): Reciprocal capsular transformations of pneumococci. *J. Bacteriol.* **77** (3): 296-309

**Reyes A., Leiva A., Cambiazo V., Méndez M. & González M.** (2006): *Cop-like* operon: Structure and organization in species of the *Lactobacillales* order. *Biol. Res.* **39** (1): 87-93

**Rimini R., Jansson B., Feger G., Roberts T. C., de Francesco M., Gozzi A., Faggioni F., Domenici E., Wallace D. M., Frandsen N., Polissi A.** (2000): Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol. Microbiol.* **36** (6): 1279-1292

**Rimmele M. & Boos W.** (1994): Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176** (18): 5654-5664

**Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J. & Goodman R. M.** (2000): Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (6): 2541-2547

**Rondon M. R., Goodman R. M. & Handelsman J.** (1999): The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* **17** (10): 403-409

**Royles B. J. L.** (1995): Naturally occurring tetramic acids: Structure, isolation and synthesis. *Chem. Rev.* **95**:1981-2001

**Safo M. K., Zhao Q., Ko T. P., Musayev F. N., Robinson H., Scarsdale N., Wang A. H. & Archer G. L.** (2005): Crystal structures of the BlaI repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the *bla* and *mec* operons. *J. Bacteriol.* **187** (5): 1833-1844

- Salles C., Creancier L., Claverys J. P. & Mejean V.** (1992): The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20 (22)**: 6103
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T.** (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed., CSH press, New York, USA
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74 (12)**: 5463-5467
- Saurin W., Hofnung M. & Dassa E.** (1999): Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48 (1)**: 22-41
- Schaefer B. C.** (1995): Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227 (2)**: 255-273
- Schmees G., Stein A., Hunke S., Landmesser H. & Schneider E.** (1999): Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur. J. Biochem.* **266 (2)**: 420-430
- Schuurman-Wolters G. K. & Poolman B.** (2005): Substrate specificity and ionic regulation of GlnPQ from *Lactococcus lactis*. An ATP-binding cassette transporter with four extracytoplasmic substrate-binding domains. *J. Biol. Chem.* **280 (25)**: 23785-23790
- Schuwirth B. S., Day J. M., Hau C. W., Janssen G. R., Dahlberg A. E., Cate J. H. & Vila-Sanjurjo A.** (2006): Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13 (10)**: 879-886
- Segarra R. A., Booth M. C., Morales D. A., Huycke M. M. & Gilmore M. S.** (1991): Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. *Infect. Immun.* **59 (4)**: 1239-1246
- Serhir B., Dugourd D., Jacques M., Higgins R. & Harel J.** (1997): Cloning and characterization of a dextranase gene (*dexS*) from *Streptococcus suis*. *Gene* **190 (2)**: 257-261
- Seto H. & Tomasz A.** (1976): Calcium-requiring step in the uptake of deoxyribonucleic acid molecules through the surface of competent pneumococci. *J. Bacteriol.* **26 (3)**: 1113-1118
- Shankar N., Coburn P., Pillar C., Haas W. & Gilmore M.** (2004): Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* **293 (7-8)**: 609-18
- Shen M. M., Raleigh E. A. & Kleckner N.** (1987): Physical analysis of Tn10- and IS10-promoted transpositions and rearrangements. *Genetics* **116 (3)**: 359-369

- Sheng H., Knecht H. J., Kudva I. T. & Hovde C. J.** (2006): Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **72 (8)**: 5359-5366
- Sicard A. M.** (1964): A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformations at the *amiA* locus. *Genetics* **50 (1)**: 31-44
- Slamti L. & Lereclus D.** (2002): A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* **21 (17)**: 4550-4559
- Smith P., Karpowich N., Millen L., Moody J., Rosen J., Thomas P. & Hunt J.** (2002): ATP Binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **10 (1)**: 139-149
- Solomon J. M. & Grossman A. D.** (1996): Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* **12 (4)**:150-155
- Sorek R., Zhu Y., Creevey C. J., Francino M. P., Bork P. & Rubin E. M.** (2007): Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* **318 (5855)**: 1449-1452
- Spratt B. G., Boyd A. & Stoker N.** (1980): Defective and plaque-forming lambda transducing bacteriophage carrying penicillin-binding protein-cell shape genes: genetic and physical mapping and identification of gene products from the *lip-dacA-rodA-pbpA-leuS* region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **143 (2)**: 569-581
- Sternberg G.** (1881): A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injections of human saliva. An experimental research. *National Board of Health Bulletin* **2**: 781-783
- Stock J. B., Ninfa A. J. & Stock A. M.** (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53 (4)**: 450-490
- Stone, K. J. & Strominger J. L.** (1971): Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68 (12)**: 3223-3227
- Storm D. R. & Strominger J. L.** (1974): Binding of bacitracin to cells and protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Biol. Chem.* **249 (6)**: 1823-1827
- Story R. M. & Steitz T. A.** (1992): Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* **355 (6358)**: 374-376
- Strausak D. & Solioz M.** (1997): CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J. Biol. Chem.* **272 (14)**: 8932-8936
- Sulakvelidze A., Alavidze Z. & Morris J. G. Jr.** (2001): Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45 (3)**: 649-659

- Sung C. K., Claverys J. P. & Morrison D. A.** (2001): A *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (11): 5190-5196
- Sutcliffe I. C. & Russell R. R.** (1995): Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177** (5):1123-1128
- Takahashi Y. & Tokumoto U.** (2002): A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277** (32): 28380-28383
- Tettelin H., Nelson K. E., Paulsen I. T., Eisen J. A., Read T. D., Peterson S., Heidelberg J., DeBoy R. T., Haft D. H., Dodson R. J., Durkin A. S., Gwinn M., Kolonay J. F., Nelson W. C., Peterson J. D., Umayam L. A., White O., Salzberg S. L., Lewis M. R., Radune D., Holtzapple E., Khouri H., Wolf A. M., Utterback T. R., Hansen C. L., McDonald L. A., Feldblyum T. V., Angiuoli S., Dickinson T., Hickey E. K., Holt I. E., Loftus B. J., Yang F., Smith H. O., Venter J. C., Dougherty B. A., Morrison D. A., Hollingshead S. K. & Fraser C. M.** (2001): Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293** (5529): 498-506
- Tinoco I. Jr., Borer P. N., Dengler B., Levin M. D., Uhlenbeck O. C., Crothers D. M. & Bralla J.** (1973): Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nat. New Biol.* **246** (150): 40-41
- Tipper D. J. & Strominger J. L.** (1965): Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54** (4): 1133-1141
- Tomasz A.** (1997): Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **24** (Suppl. 1): S85-88
- Tomasz A.** (1979): The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**:113-37
- Tomasz A. & R. D. Hotchkiss** (1964): Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51** (3): 480-487
- Trieu-Cuot P. & Courvalin P.** (1983): Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23** (3): 331-341
- Trombe M. C.** (1993): Characterization of a calcium porter of *Streptococcus pneumoniae* involved in calcium regulation of growth and competence. *J. Gen. Microbiol.* **139** (3): 433-439
- Tsuda H., Yamashita Y., Shibata Y., Nakano Y. & Koga T.** (2002): Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (12): 3756-3764
- Umezawa H., Mizuno S., Yamazaki H. & Nitta K.** (1968): Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycins. *J. Antibiot.* **21** (3): 234-236

- van der Heide T. & Poolman B.** (2000): Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (13): 7102-7106
- van der Heide T. & Poolman B.** (2002): ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.* **3** (10): 938-943
- van Veen H. W., Venema K., Bolhuis H., Oussenko I., Kok J., Poolman B., Driessen A. J. M., & Konings W. N.** (1996): Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (20): 10668–10672
- Volz C.** (2008): Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie Piperacillin-resistenter Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, TU Kaiserslautern
- Ullmann A. & Perrin D.** (1970): The lactose operon. Beckwith J., Zipser D. (ed.); Cold Spring Harbor New York: 143-172
- Walker G. J., Pulkownik A. & Morrey-Jones J. G.** (1981): Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **127** (1): 201-208
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J. & Gay N. J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951
- Walsh C.** (2000): Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406** (6797): 775-781
- Wang R. F. & Kushner S. R.** (1991): Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199
- Watanabe K., Chishiro K., Kitamura K. & Suzuki Y.** (1991): Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* **266** (36): 24287-24289
- Watanabe K., Kitamura K., Iha H. & Suzuki Y.** (1990): Primary structure of the oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC7064 deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *Eur. J. Biochem.* **192** (3): 609-620
- Ween O., Gaustad P. & Håvarstein L. S.** (1999): Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **33** (4): 817-827
- Weisblum B. & Davies J.** (1968): Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.* **32** (4 Pt 2): 493-528

- Wild J., Hradecna Z. & Szybalski W.** (2002): Conditionally Amplifiable BACs: Switching From Single-copy to High-Copy Vektors and Genomic Clones. *Genome Research* **12 (9)**: 1434-1444
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M. Jr., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vonrhein C., Hartsch T. & Ramakrishnan V.** (2000): Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407 (6802)**: 327-339
- Wink J. M., Kroppenstedt R. M., Ganguli B. N., Nadkarni S. R., Schumann P., Seibert G., & Stackebrandt E.** (2003): Three new antibiotic producing species of the genus *Amycolatopsis*, *Amycolatopsis balhimycina* sp. nov., *A. tolypomycina* sp. nov., *A. vancoresmycina* sp. nov., and description of *Amycolatopsis keratiniphila* subsp. *keratiniphila* subsp. nov. and *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* subsp. nov.. *Syst. Appl. Microbiol.* **26 (1)**: 38-46.
- Withey S., Cartmell E., Avery L. M. & Stephenson T.** (2005): Bacteriophages--potential for application in wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* **339 (1-3)**: 1-18
- Wittman V., Lin H. C. & Wong H. C.** (1993): Functional domains of the penicillinase repressor of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **175 (22)**: 7383-7390
- Wittwer C. T., Ririe K. M., Andrew R. V., David D. A., Gundry R. A. & Balis U. J.** (1997): The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22 (1)**: 176-181
- Yanisch-Perron C., Vieira J. & Messing J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33 (1)**: 103-119
- Yoshizawa S., Fourmy D. & Puglisi J. D.** (1998): Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* **17 (22)**: 6437-6448
- Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. & Noller H. F.** (2001): Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292 (5518)**: 883-96



## *Mein herzlicher Dank geht an ...*

... Prof. Regine Hakenbeck für die Bereitstellung des äußerst interessanten Themas, für die Anregungen und Ideen sowie für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

... Prof. Bernhard Henrich für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft und für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Erstgutachtens.

... Prof. John Cullum für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

... Prof. Dr. Seibert (Sanofi-Aventis) für die großzügige Überlassung des Antibiotikums Vancoresmycin.

... PD Dr. Reinhold Brückner für sein großes Interesse an dieser Arbeit, für seine Tipps und Tricks sowie für die Diskussionen und Anregungen.

... Dr. Dalia Denapaite für die Anregungen und Hilfestellungen insbesondere bei der Erstellung von Genbanken und PCR-Techniken, für die schöne Zeit, für das Zuhören, für die Kinobesuche, für das Essen gehen und für das Essen kochen.

... Alexander Halfmann für das Teilen des Büros und des Labors sowie für das Lehren vieler Techniken und Methoden und für die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb der Uni.

... Marta Kovacs für die Anregungen, für die Hilfestellungen, für das offene Ohr und für die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb der Uni.

... Ulrike Klein für ihre zahlreichen Tipps und Hilfestellungen.

... alle Mitarbeiter und ehemalige Mitarbeiter für die schöne Zeit in Kaiserslautern.

... meine Eltern und an meine Schwester Katrin für das Vertrauen in mich und für das Dasein, für die aufmunternden Telefonate und für die große Unterstützung.

... Matthias für das tapfere Lächeln, wenn es wieder über Pneumos und Vancoresmycin ging, für den Rückhalt sowie für die Diskussionen und Anregungen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Petra Becker  
Anschrift: Ellerstadter Str. 81  
67071 Ludwigshafen  
Geburtsdatum: 26.02.1980  
Geburtsort: Aschaffenburg  
Familienstand: ledig

## Ausbildung:

seit 06/2004: wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion am Lehrstuhl  
Mikrobiologie der TU Kaiserslautern  
07/2003-04/2004: Diplomarbeit in der BASF AG Ludwigshafen  
Thema: Screening nach neuen Esterasen  
06/2003: Diplomprüfungen in Biochemie, Mikrobiologie, Pharmakologie/  
Toxikologie  
10/1999-04/2004: Biologiestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
1990-1999: Maria-Ward-Schule in Aschaffenburg; Abitur  
1986-1990: Grundschule Mespelbrunn