

**PBP2x-Mutationen in *Streptococcus pneumoniae*:
Auswirkungen auf β -Laktam-Resistenz
und Zellphysiologie**

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

von

Dipl.-Biol. Ilka Zerfaß

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 31.03.2010

Vorsitzender der Prüfungskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum
3. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Sven Hammerschmidt

Kaiserslautern, 2010

D 386

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck angefertigt.

Hiermit bestätige ich, Ilka Zerfaß, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, den 22.12.2009

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	4
1.1.1 Geschichte	4
1.1.2 Biologie und Pathogenität	4
1.2 β-Laktam-Resistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
1.2.1 Peptidoglykan – Die bakterielle Achillesferse in der Zellwand	6
1.2.2 Penicillin-Bindeproteine – Die Targets von β -Laktamen	9
1.2.3 β -Laktame – Eine Waffe wird stumpf.....	12
1.2.4 Penicillin-Bindeproteine als Resistenzdeterminanten in klinischen Isolaten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
1.2.5 Penicillin-Bindeproteine als Resistenzdeterminanten in Labormutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
1.3 PBP2x: Die wichtigste primäre Resistenzdeterminante in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
1.4 Das Zwei-Komponenten-System ComDE: Regulator der genetischen Kompetenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.5 Das Zwei-Komponenten-System CiaRH: Regulatorische Schaltstelle zwischen Resistenz, Kompetenz und Virulenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Bakterienstämme.....	29
2.2 Vektoren und Plasmide.....	32
2.3 Oligonukleotide.....	33
2.4 Nährmedien.....	40
2.4.1 C-Medium (CpH8).....	40
2.4.2 M17-Medium.....	42
2.4.3 Todd Hewitt-Broth (THB-Medium).....	43
2.4.4 D-Blutagar	43
2.4.5 Lysogeny-Broth (LB-Medium).....	44
2.5 Nährmedienzusätze.....	44
2.6 Mikrobiologische Methoden	45
2.6.1 Konservierung von Stämmen.....	45

2.6.2	Anzuchtbedingungen.....	45
2.6.3	Messung des Wachstums.....	46
2.6.4	Mikroskopie.....	46
2.6.4.1	Phasenkontrastmikroskopie	47
2.6.4.2	Fluoreszenzmikroskopie	47
2.6.5	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	48
2.6.6	Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
2.6.6.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	49
2.6.6.2	Transformation.....	49
2.6.6.3	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	50
2.6.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	50
2.6.7.1	Herstellung kompetenter Zellen	51
2.6.7.2	Transformation.....	51
2.6.7.3	Blau-Weiß-Selektion	52
2.6.7.4	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	52
2.7	Molekularbiologische Methoden	53
2.7.1	Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	53
2.7.1.1	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	53
2.7.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	54
2.7.1.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	55
2.7.1.4	Elution von PCR-Produkten aus Agarosegelen.....	55
2.7.1.5	Isolierung von RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
2.7.1.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	58
2.7.1.7	Quantifizierung von DNA und RNA.....	59
2.7.2	Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren.....	60
2.7.2.1	Restriktionsverdau.....	60
2.7.2.2	Ligation	61
2.7.2.3	Herstellung von 3'-A-Überhängen	63
2.7.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	64
2.7.2.5	Sequenzierung von DNA.....	68
2.7.2.6	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	70
2.7.3	Chromosomale Modifikation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
2.7.3.1	Herstellung der Thr338-Punktmutanten mittels gerichteter Mutagenese durch Überhangsverlängerung	73
2.7.3.2	Herstellung der R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349} -Transformante mithilfe der Janus-Kassette.....	75
2.7.3.3	Herstellung von <i>pbp1a</i> -Deletionsderivaten.....	77
2.7.3.4	Herstellung von <i>ciaR</i> -Inaktivierungsderivaten.....	78
2.7.3.5	Herstellung von <i>comAB</i> -Inaktivierungsderivaten.....	79
2.7.3.6	Herstellung eines <i>pbp2b</i> -Inaktivierungsderivats	80
2.7.3.7	Herstellung eines <i>pbp2b</i> -Deletionsderivats.....	81
2.7.4	Microarray-gestützte Transkriptomanalyse	82
2.7.4.1	Das <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set	83
2.7.4.2	Herstellung der DNA-Chips.....	84
2.7.4.3	Herstellung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe	86
2.7.4.4	Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe.....	87
2.7.4.5	Erfassung der Microarray-Daten	88
2.7.4.6	Extraktion, Prozessierung und Analyse der Microarray-Daten	89
2.8	Biochemische Methoden	91
2.8.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	91
2.8.1.1	Herstellung des Polyacrylamidgels	92
2.8.1.2	Probenvorbereitung	93
2.8.1.3	Elektrophorese	94
2.8.1.4	Detektion der Penicillin-Bindeproteine	95

2.8.2	Western-Blotting.....	97
2.8.2.1	Herstellung des Polyacrylamidgels	97
2.8.2.2	Probenvorbereitung	98
2.8.2.3	Elektrophorese	98
2.8.2.4	Blotting.....	99
2.8.2.5	Immundetektion	99
2.8.3	Präparation und Analyse von Pneumokokken-Zellwand.....	101
2.8.3.1	Herstellung der Zelllysate zur Isolierung der Zellwand.....	102
2.8.3.2	Isolierung und HPLC-Analyse der Zellwand und Muropeptide.....	103
2.9	Computergestützte Datenverarbeitung, -analyse und -abfrage	103
2.10	Bezugsquellen.....	105
3	ERGEBNISSE.....	106
3.1	Mutationsanalyse der Position Thr338 im PBP2x von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	107
3.1.1	Einführung einer Thr338-Punktmutation in PBP2x	107
3.1.1.1	Gerichtete Mutagenese des <i>pbp2x</i> von <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	108
3.1.1.2	Selektion von R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten	109
3.1.2	Eine Thr338-Punktmutation und die β -Laktam-Resistenz.....	110
3.1.2.1	β -Laktam-Resistenz der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.....	110
3.1.2.2	β -Laktam-Affinität der PBP2x _{T338} -Derivate	113
3.1.3	Eine Thr338-Punktmutation in Kombination mit einem Mosaik-PBP1a	114
3.1.3.1	Selektion von R6 _{<i>pbp2xT338pbp1a2349</i>} -Transformanten	114
3.1.3.2	Selektion einer R6 _{<i>pbp2xC606pbp1a2349</i>} -Transformante	115
3.1.3.3	β -Laktam-Resistenz einer R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} -Transformante	116
3.1.4	Eine Thr338-Punktmutation in Kombination mit einem nichtfunktionellen Zwei-Komponenten-System CiaRH	123
3.1.4.1	Inaktivierung von <i>ciaR</i> in den R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.....	123
3.1.4.2	Inaktivierung von <i>ciaR</i> in der Mutante C303.....	127
3.1.4.3	Auswirkungen der <i>ciaR</i> -Inaktivierung in der Mutante C303 auf die Zellwand-Zusammensetzung.....	131
3.1.4.4	Inaktivierung von <i>ciaR</i> in der R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>pbp1a</i> -Allelen.....	143
3.1.5	Eine Thr338-Punktmutation und die genetische Kompetenz.....	146
3.1.5.1	Inaktivierung von <i>comAB</i> in R6, der C303-, R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante und den entsprechenden <i>ciaR</i> -Inaktivierungsderivaten	147
3.1.5.2	Transformationeffizienz der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.....	151
3.1.5.3	Transformationeffizienz der R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -, R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -Mutante und der entsprechenden <i>pbp1a2349</i> -Derivate.....	152
3.1.6	Eine Thr338-Punktmutation auf globaler Transkriptomebene.....	154
3.1.6.1	Das Transkriptom der R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -Mutante.....	155
3.1.6.2	Das Transkriptom der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349pbp1a2349</i>} -Transformante im Vergleich.....	161
3.2	Globale Transkriptomanalyse von spontanresistenten <i>Streptococcus pneumoniae</i>-Mutanten mit Punktmutationen im PBP2x	164
3.2.1	Globale Transkriptomanalyse der Mutantenfamilie C006.....	165
3.2.1.1	Wachstumsverhalten und Cefotaxim-Resistenz der Mutantenfamilie C006.....	166
3.2.1.2	Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006.....	169
3.2.1.3	Das Transkriptom der Mutante C606 bei 30 und 37 °C im Vergleich.....	178

3.2.2	Globale Transkriptomanalyse der Mutanten C301, C401, C202 und C402.....	180
3.2.2.1	Wachstumsverhalten und Cefotaxim-Resistenz der Mutanten C301, C401, C202 und C402.....	182
3.2.2.2	Das Transkriptom der Mutanten C301, C401, C202 und C402	185
3.3	Darstellung einer <i>pbp2b</i>-Inaktivierungs- und Deletionsmutante von <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	193
3.3.1	Inaktivierung von <i>pbp2b</i> in <i>Streptococcus pneumoniae</i> durch die Integration einer Resistenzkassette	195
3.3.2	In-frame-Deletion von <i>pbp2b</i> in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	199
4	DISKUSSION.....	202
4.1	PBP2x-Mutationen und die β-Laktam-Resistenz	203
4.2	PBP2x-Mutationen und die Zellphysiologie	207
4.2.1	PBP2x-Mutationen: Auswirkungen auf die Zelle	207
4.2.1.1	Wachstum, Morphologie und Vitalität	207
4.2.1.2	Zellwand-Zusammensetzung	208
4.2.1.3	Metabolismus.....	210
4.2.2	PBP2x-Mutationen und das Zwei-Komponenten-System CiaRH.....	215
4.2.3	PBP2x-Mutationen und die genetische Kompetenz	221
4.3	PBP2x und PBP1a.....	226
4.4	PBP2x, CiaRH und ComDE – eine Zusammenfassung.....	229
4.5	PBP2b von <i>Streptococcus pneumoniae</i> – oder der Versuch ein bis dato essentielles Protein zu deletieren.....	232
4.6	Ausblick	236
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	239
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	243
7	ANHANG	270
DANKSAGUNG	321
LEBENS LAUF	323
PUBLIKATIONEN	324

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Grundstruktur des Peptidoglykans in <i>Streptococcus pneumoniae</i> und die von Penicillin-Bindeproteinen katalysierten Reaktionen.....	7
Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der Penicillin-Bindeproteine von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
Abb. 1.3: Übersicht über die Familien spontan Cefotaxim-resistenter <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Mutanten.....	15
Abb. 1.4: Schematischer Aufbau und dreidimensionale Struktur des PBP2x von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
Abb. 1.5: Resistenz-relevante PBP2x-Punktmutationen in Labormutanten und klinischen Isolaten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
Abb. 1.6: Regulation der genetischen Kompetenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
Abb. 2.1: Herstellung der Thr338-Punktmutanten mittels gerichteter Mutagenese durch Überhangsverlängerung.....	74
Abb. 2.2: Strategie zur Einführung des 2349- <i>pbp1a</i> in die R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante mithilfe der Janus-Kassette.....	76
Abb. 2.3: Herstellung von <i>pbp1a</i> -Deletionsderivaten.....	77
Abb. 2.4: Herstellung von <i>ciaR</i> -Inaktivierungsderivaten.....	78
Abb. 2.5: Herstellung von <i>comAB</i> -Inaktivierungsderivaten.....	79
Abb. 2.6: Herstellung eines <i>pbp2b</i> -Inaktivierungsderivats.....	80
Abb. 2.7: Herstellung eines <i>pbp2b</i> -Deletionsderivats.....	82
Abb. 3.1: Alignment der Aminosäuresequenz um die Position Thr338 des PBP2x von resistenten <i>Streptococcus pneumoniae</i> - und resistenten und sensitiven oralen Streptokokken-Isolaten.....	108
Abb. 3.2: β -Laktam-Resistenz der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.....	111
Abb. 3.3: Mosaikstruktur des <i>pbp2x</i> der Transformante R6 _{<i>pbp2x2349</i>}	112
Abb. 3.4: β -Laktam-Affinität der PBP2x _{T338} -Derivate.....	113
Abb. 3.5: PBP2x in den R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.....	114
Abb. 3.6: Mosaikstruktur des <i>pbp1a</i> von <i>Streptococcus pneumoniae</i> 2349.....	115
Abb. 3.7: β -Laktam-Resistenz der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} -Transformante.....	118
Abb. 3.8: β -Laktam-Resistenz der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a::aphIII</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349pbp1a::aphIII</i>} -Mutante.....	120
Abb. 3.9: PBP-Profil der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} -Transformante.....	121
Abb. 3.10: PBP1a und PBP2x in der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} -Transformante.....	122
Abb. 3.11: Wachstum der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	124
Abb. 3.12: Vitalität der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	127
Abb. 3.13: Zusammensetzung der C003-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.....	128
Abb. 3.14: Wachstum von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	129
Abb. 3.15: Vitalität von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH...	131

Abb. 3.16: Wachstum von R6, C103, C303, C303 _{<i>ciaR::aad9</i>} und R6 _{<i>pbp2xC303</i>} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid.	134
Abb. 3.17: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.	137
Abb. 3.18: Relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.	140
Abb. 3.19: Relativer Anteil der zusammengefassten monomeren, dimeren und trimeren Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.	141
Abb. 3.20: Relativer Anteil der zusammengefassten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.	142
Abb. 3.21: Wachstum der R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>pbp1a</i> -Allelen und Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.	144
Abb. 3.22: Wachstum von R6, der C303- und R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>ciaR</i> -Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB.	148
Abb. 3.23: Cefotaxim-Resistenz von R6, der C303- und R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>ciaR</i> -Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB....	150
Abb. 3.24: Transformationseffizienz der R6 _{<i>pbp2xT338</i>} -Mutanten.	151
Abb. 3.25: Transformationseffizienz der R6 _{<i>pbp2x2349pbp1a2349</i>} -, R6 _{<i>pbp2x2349</i>} - und R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante.	153
Abb. 3.26: Transformationseffizienz der R6 _{<i>pbp2x2349pbp1a2349</i>} -, R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -, R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} - und R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante.	154
Abb. 3.27: Das Transkriptom der R6 _{<i>pbp2xT338G</i>} -Mutante bei einer Zelldichte von N=40.	159
Abb. 3.28: Das Transkriptom der R6 _{<i>pbp2x2349</i>} -Transformante bei einer Zelldichte von N=40.	161
Abb. 3.29: Das Transkriptom der R6 _{<i>pbp2xT338Gpbp1a2349</i>} - und R6 _{<i>pbp2x2349pbp1a2349</i>} -Transformante bei einer Zelldichte von N=40 im Vergleich.	164
Abb. 3.30: Zusammensetzung der C006-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.	165
Abb. 3.31: Wachstum der Mutantenfamilie C006.	166
Abb. 3.32: Cefotaxim-Resistenz der Mutantenfamilie C006.	168
Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40.	178
Abb. 3.34: Das Transkriptom von C606 bei einer Zelldichte von N=40 bei 30 und 37 °C im Vergleich.	180
Abb. 3.35: Zusammensetzung der C001- und C002-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.	181
Abb. 3.36: Wachstum der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.	183
Abb. 3.37: Cefotaxim- und Oxacillin-Resistenz der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.	184
Abb. 3.38: Das Transkriptom von C301 bei einer Zelldichte von N=40.	186
Abb. 3.39: Das Transkriptom von C401 bei einer Zelldichte von N=40.	189
Abb. 3.40: Das Transkriptom von C202 bei einer Zelldichte von N=40.	191
Abb. 3.41: Das Transkriptom von C402 bei einer Zelldichte von N=40.	193
Abb. 3.42: Strategie von Kell und Mitarbeitern zur Inaktivierung von <i>pbp2b</i> in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	194
Abb. 3.43: Ergebnisse der Überprüfung der Inaktivierung von <i>pbp2b</i> in R6.	197
Abb. 3.44: PBP-Profil der R6- <i>pbp2b</i> -Inaktivierungstransformanten.	198
Abb. 3.45: Ergebnisse der Überprüfung der Inaktivierung und Deletion von <i>pbp2b</i> in M31.	199

Abb. 3.46: Ergebnisse der 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von <i>pbp2b</i>	200
Abb. 4.1: Hypothetisches Modell zum Zusammenspiel von PBP2x, CiaRH und ComDE bei der Regulation der genetischen Kompetenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	231
Abb. 4.2: Genetische Organisation von <i>pbp2b</i> und seinen Homologen in Streptokokken, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Escherichia coli</i>	234
Abb. 7.1: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein.....	271
Abb. 7.2: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid.	273
Abb. 7.3: Strukturen der in der Zellwand von R6, C103, C303, C303 _{<i>ciaR::aad9</i>} und R6 _{<i>pbp2xC303</i>} detektierten Muropeptide.....	276

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Ausgangsstämme von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
Tab. 2.2: Konstruierte Derivate von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
Tab. 2.3: <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	32
Tab. 2.4: Vektoren und Plasmide.....	32
Tab. 2.5: Oligonukleotide zur chromosomalen Modifikation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	33
Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Überprüfung der chromosomalen Modifikation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp2x</i>	37
Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp2a</i>	37
Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp1a</i>	38
Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>ciaRH</i>	38
Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>cpoA</i>	38
Tab. 2.12: Oligonukleotide zur Amplifikation von <i>aroE</i>	39
Tab. 2.13: Oligonukleotide zur Durchführung der 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE).....	39
Tab. 2.14: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung klonierter Fragmente.....	39
Tab. 2.15: Zusammensetzung des C-Mediums.....	40
Tab. 2.16: Zusammensetzung der Komponenten des C-Mediums.....	40
Tab. 2.17: Zusammensetzung der Zusätze der Komponenten des C-Mediums.....	41
Tab. 2.18: Zusammensetzung des M17-Mediums.....	42
Tab. 2.19: Zusammensetzung des THB-Mediums.....	43
Tab. 2.20: Zusammensetzung des D-Agars.....	44
Tab. 2.21: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	44
Tab. 2.22: Nährmedienzusätze.....	45
Tab. 2.23: Lösungen zur Fluoreszenzmikroskopie.....	48
Tab. 2.24: Lösungen zur Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	54
Tab. 2.25: Lösungen zur Isolierung von RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
Tab. 2.26: Zusammensetzung eines Ansatzes zum DNase-Verdau.....	58
Tab. 2.27: Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese.....	59
Tab. 2.28: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.....	61
Tab. 2.29: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.....	62
Tab. 2.30: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Herstellung von 3'-A-Überhängen.....	63
Tab. 2.31: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	65
Tab. 2.32: Zusammensetzung eines PCR-Programms.....	66
Tab. 2.33: Zusammensetzung eines PCR-Programms zur überlappenden PCR.....	67
Tab. 2.34: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Sequenzreaktion.....	69
Tab. 2.35: Zusammensetzung eines Programms zur Sequenzreaktion.....	69
Tab. 2.36: Zusammensetzung eines Ansatzes zur TAP-Behandlung von RNA.....	71

Tab. 2.37: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes mit RNA-Oligonukleotid.....	72
Tab. 2.38: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Amplifikation der cDNA.	72
Tab. 2.39: Zusammensetzung eines Programms zur Amplifikation der cDNA.....	73
Tab. 2.40: Einstellungen des verwendeten Printing-Protokolls.	85
Tab. 2.41: Einstellungen des verwendeten Hybridisierungs-Protokolls.....	87
Tab. 2.42: Lösungen zur Hybridisierung.	88
Tab. 2.43: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels.....	92
Tab. 2.44: Lösungen zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.	95
Tab. 2.45: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels.....	98
Tab. 2.46: Lösungen zum Western-Blotting.	100
Tab. 3.1: Selektion der R6 _{pbp2xT338} -Mutanten.	109
Tab. 3.2: Daten zum Wachstum der R6 _{pbp2xT338} -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	125
Tab. 3.3: Daten zum Wachstum von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	130
Tab. 3.4: Selektion der R6 _{pbp2xC303} -Transformante.....	133
Tab. 3.5: Daten zum Wachstum von R6, C103, C303, C303 _{ciaR::aad9} und R6 _{pbp2xC303} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid.	135
Tab. 3.6: Übersicht über die bei der Zellwand-Analyse von R6, C103, C303, C303 _{ciaR::aad9} und R6 _{pbp2xC303} gewonnenen Muropeptidprofile.	136
Tab. 3.7: Daten zum Wachstum der R6 _{pbp2xT338G} - und R6 _{pbp2x2349} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>pbp1a</i> -Allelen und Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.....	145
Tab. 3.8: Daten zum Wachstum von R6, der C303- und R6 _{pbp2xT338G} -Mutante in Kombination mit verschiedenen <i>ciaR</i> -Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB....	149
Tab. 3.9: Daten zum Wachstum der Mutantenfamilie C006.	167
Tab. 3.10: Daten zum Wachstum der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.....	183
Tab. 7.1: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.	277
Tab. 7.2: Relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.....	278
Tab. 7.3: Das Transkriptom der R6 _{pbp2xT338G} - und R6 _{pbp2x2349} -Mutante bei einer Zelldichte von N=40.....	279
Tab. 7.4: Das Transkriptom der R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349} - und R6 _{pbp2x2349pbp1a2349} -Transformante bei einer Zelldichte von N=40 im Vergleich.	285
Tab. 7.5: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40.....	291
Tab. 7.6: Das Transkriptom von C606 bei einer Zelldichte von N=40 bei 30 und 37 °C im Vergleich.....	299
Tab. 7.7: Das Transkriptom von C301 und C401 bei einer Zelldichte von N=40.	304
Tab. 7.8: Das Transkriptom von C202 und C402 bei einer Zelldichte von N=40.	309

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin	Glc	Glukose
AA	Acrylamid, Alanin-Alanin	GlcNAc	N-Acetylglukosamin
AATGal	2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galaktose	GMP	Guanosinmonophosphat
ABC	ATP-Binding-Cassette	GTP	Guanosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat	HK	Histidin-Kinase
Amp	Ampicillin	hmw	high molecular weight
AMP	Adenosinmonophosphat	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
AMV	Avian Myoblastosis Virus	IMP	Inosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase	IPTG	Isopropylthiogalaktosid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	IS	Insertionssequenz
AS	Aminosäure(n)	Kan	Kanamycin
ATP	Adenosintriphosphat	kb	kilobase(s)
AVG	Average	KD	Kinase-Domäne
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	kDa	kiloDalton
BAA	Bisacrylamid	konz.	konzentriert
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	LB	Lysogeny-Broth
bp	base pair(s)	lmw	low molecular weight
BSA	Bovine Serum Albumine	LOWESS	Locally Weighted Scatter Plot Smoothing
Bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	LTA	Lipo Teichoic Acid
C	Cefotaxim	M	N-Acetylmuraminsäure
CBP	Cholin-Bindeproteine	mAU	milli Absorbance Units
cDNA	complementary DNA	MCS	Multiple Cloning Site
cfu	colony-forming units	MHK	Minimale Hemmkonzentration
CM	Cytoplasmamembran	mol%	Molprozent
CSP	Competence Stimulating Peptide	mRNA	messenger RNA
csRNA	<i>cia</i> controlled small RNA	MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
<i>cup</i>	competence up	mut	mutagenisiert
Cyl	Cytolysin	N	Nephelo-Einheit(en)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	n.z.	nicht zählbar
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	NAE	Na-Acetat-EDTA
<i>dwl</i>	division and cell wall cluster 1	NAES	Na-Acetat-EDTA-SDS
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat	NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
deAc	deacetyliert	OAc	O-acetyliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat	OD	Optische Dichte, Output-Domäne
DNase	Desoxyribonuklease	P	Piperacillin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	p.a.	pro analysi
DOC	Desoxycholat	PASTA	PBP And Serin/Threonine Kinase Associated Domain
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	PBD	Penicillin-Binde-Domäne
Eco	<i>Escherichia coli</i>	PBP	Penicillin-Bindeprotein(e)
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid	PBS	Phosphate-Buffered Saline
FDR	False Discovery Rate	PBST	Phosphate-Buffered Saline Tween
FM	Forward Mutagenese	PCR	Polymerase Chain Reaction
FT-ICR	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance	pH	pondus Hydrogenii
FWER	Family-Wise Error Rate	PI	Propidiumjodid
G	N-Acetylglukosamin	PMT	Photomultiplier Tube
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin		

(p)ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat	U	Unit
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat	UDP	Uridindiphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Upm	Umdrehungen pro Minute
R	resistent	UTP	Uridintriphosphat
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends	v	version
RD	Receiver-Domäne	v/v	volume/volume
REC	Receiver	Vol.	Volumen
RH	Relative Humidity	WAT	WATER
RitP	Ribitol-5-phosphat	WTA	Wall Teichoic Acid
RM	Reverse Mutagenese	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
RNase	Ribonuklease	XMP	Xanthosinmonophosphat
RR	Response-Regulator	ZW	Zellwand
rRNA	ribosomal RNA		
RT	Reverse Transkription		
S	sensitiv		
S*	aktives Serin		Aminosäuren sind im Ein- oder Dreibuchstaben-code wiedergegeben
S.	<i>Streptococcus</i>		
S.p.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
SA	Serin-Alanin		
Sag	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>		
SD	Sensor-Domäne, Shine-Dalgarno		
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate		
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
Sgo	<i>Streptococcus gordonii</i>		
Sm	<i>Streptococcus mitis</i>		
Smi	<i>Streptococcus mitis</i>		
Smu	<i>Streptococcus mutans</i>		
So	<i>Streptococcus oralis</i>		
Sp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Spc	Spectinomycin		
Spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Spy	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
Ssa	<i>Streptococcus sanguinis</i>		
SSC	Saline Sodium Citrate		
Sth	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
Str	Streptomycin		
TA	Teichoic Acid		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase		
TCS	Two Component Signal Transduction System		
TE	Tris-EDTA		
tech.	technisch		
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin		
Tet	Tetrazyklin		
THB	Todd Hewitt-Broth		
T _m	melting Temperature		
TM	Transmembran		
tRNA	transfer RNA		

1 Einleitung

... One sometimes finds what one is not looking for ...

Eine der wohl wichtigsten und weitreichsten Entwicklungen des 20. Jahrhunderts entstammte der zufälligen Beobachtung von Alexander Fleming im Jahre 1928, dass das Wachstum von Staphylokokken durch einen kontaminierenden Schimmelpilz inhibiert wurde. Fleming stellte fest, dass ein Extrakt dieses Pilzes auch gegen andere pathogene Bakterien wirksam war und keinerlei Toxizität gegenüber Tieren zeigte. Damit begann die Geschichte des Penicillins – so nannte Fleming den Extrakt, nach der Gattung des Schimmelpilzes, aus dem er gewonnen wurde (Fleming, 1980). Dennoch sollte es mehr als zehn Jahre dauern, bis dieses Wundermittel seinen Siegeszug antreten konnte. So gelang erst Howard W. Florey und Ernest B. Chain die Isolierung des antibakteriellen Wirkstoffs aus dem Extrakt und der Nachweis seiner Wirksamkeit beim Menschen, was schließlich die Einführung des Penicillins als Therapeutikum 1941 und seinen effektiven Gebrauch zur Folge hatte. Endlich schien der Kampf gegen die lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen gewonnen. Den bereits wenige Jahre später auftretenden Resistenzen wurde nur wenig Beachtung geschenkt; sie galten als unbedenkliche Einzelfälle. Die nun folgende weltweite Ausbreitung Penicillin-resistenter pathogener Bakterien strafte nicht nur diesen Optimismus, sondern demonstrierte auch auf erschreckende Art und Weise, wer die Oberhand in diesem ungleichen Kampf hatte.

Streptococcus (S.) pneumoniae ist zum Paradigma der Evolution von Penicillin-Resistenz geworden. Dieses Bakterium galt für fast 25 Jahre als eines der Penicillin-sensitivsten Bakterien überhaupt. Vereinzelt Berichte von Penicillin-resistenten Labormutanten wurden als nicht bedeutend angesehen (Eriksen, 1945; McKee und Houck, 1943), und auch die ersten Berichte von resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten zwischen 1965 und 1971 in Boston, Australien und auf Neuguinea erregten noch keine größere Aufmerksamkeit (Gratten *et al.*, 1980; Hansman und Bullen, 1967; Hansman *et al.*, 1974; Hansman *et al.*, 1971; Kislak *et al.*, 1965). 1977 traten zum ersten Mal in einem südafrikanischen Hospital innerhalb eines kurzen Zeitraums mehrere Pneumokokken-Stämme auf, die nicht nur eine hohe Penicillin-Resistenz aufwiesen, sondern gleichzeitig auch eine Multiresistenz gegen andere Antibiotika wie Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Rimfampicin, Streptomycin und Tetrazyklin an den Tag legten (Jacobs *et al.*, 1978). Bald darauf tauchten mit zunehmender Häufigkeit weltweit multiresistente *S. pneumoniae*-Stämme auf, allen voran in Südafrika, Spanien und Ungarn (Appelbaum, 1987, 2002; Klugman, 1990). Angesichts der Tatsache, dass weltweit über 1,6 Millionen Todesfälle pro Jahr durch Pneumokokken-Infektionen verursacht werden (Janoff und Rubins, 2004; WHO, 2007), und dass Penicillin und seine Derivate immer noch die Antibiotika der Wahl bei der Behandlung dieser Infektionen sind, ist diese Resistenzentwicklung inzwischen zu einem schwerwiegenden Problem geworden.

Fleming selbst nannte seine Entdeckung immer einen glücklichen Zufall, einen Zufall, der demjenigen zukommt, welcher offen ist für das Neue, wie es ein Forscher sein sollte. Seiner Zeit

sprach er bereits Warnungen aus, dass Bakterien gegen Antibiotika resistent werden können. Das, was Fleming befürchtet hatte, trat ein: Heute sehen wir uns wieder mit bakteriellen Infektionen konfrontiert, die längst überwunden geglaubt schienen. Die Geschichte des Penicillins und dem mit ihr eng verbundenen Pneumococcus ist nur ein Beispiel für viele, das zeigt, was passiert, wenn der Mensch eine solch mächtige Waffe in die Hand bekommt. Zugleich stellt sie aber auch eine Herausforderung dar, eine Herausforderung für den Menschen, von zwei noch mächtigeren Waffen Gebrauch zu machen, nämlich seinem Intellekt und Forscherdrang. Beide könnten ihn befähigen, die Resistenzentwicklung bei Bakterien zu verstehen und vorausschauend und nachhaltig zu wirken.

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

... Those blue beach balls from hell ...

1.1.1 Geschichte

1881 wurde *S. pneumoniae* erstmals von Georg M. Sternberg in den USA und Louis Pasteur in Frankreich fast zeitgleich isoliert und beschrieben (in White, 1938). Bis das Bakterium 1974 seine jetzige Bezeichnung „*Streptococcus pneumoniae*“ erhielt (Bergey *et al.*, 1974), wurde es unter vielen verschiedenen Namen geführt, unter anderem unter *Diplococcus pneumoniae*, was das bevorzugte Wachstum in Paaren zum Ausdruck bringen sollte. Innerhalb weniger Jahre konnte *S. pneumoniae* als Ursache vieler Erkrankungen wie Lungenentzündung (Pneumonie), Mittelohrentzündung (Otitis media), Nasennebenhöhlenentzündung (Sinusitis), Hirnhautentzündung (Meningitis), Herzmuskelinnenhautentzündung (Endocarditis) und Bakteriämie identifiziert werden (Feldman und Klugman, 1997; Musher, 1992). Eine große Bedeutung bekam *S. pneumoniae* 1928 durch die bahnbrechenden Arbeiten von Frederick Griffith zur Transformation der Pneumokokken-Kapsel, welche den Beginn der modernen Molekularbiologie einläuteten. Zu dieser Zeit war bereits bekannt, dass die Polysaccharidkapsel von *S. pneumoniae* den Hauptvirulenzfaktor dieses Organismus darstellt. Griffith zeigte, dass die Fähigkeit zur Kapsel-Produktion und damit Pathogenität von hitzeabgetöteten, bekapselten Pneumokokken-Stämmen auf lebende, unbekapselte Stämme übertragen werden kann (Griffith, 1928). Die molekulare Erklärung dieses Phänomens lieferten 1944 Oswald T. Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty, welche die DNA als „transformierendes Prinzip“ und damit als Träger der genetischen Information zur Kapselbildung identifizierten (Avery *et al.*, 1944). Aus dem von Avery und Mitarbeitern verwendeten unbekapselten Stamm D39 (R36A) wurde der ebenfalls Kapsel-freie Stamm R6 (Ottolenghi und Hotchkiss, 1962) isoliert, der aufgrund seiner hohen Transformierbarkeit und Apathogenität mittlerweile weltweit standardmäßig für wissenschaftliche Untersuchungen eingesetzt wird. Im Jahre 2001 wurde die Genomsequenz dieses Stammes von Hoskins und Mitarbeitern publiziert (Hoskins *et al.*, 2001), 2007 folgte die Veröffentlichung des Genoms von D39 (Lanie *et al.*, 2007).

1.1.2 Biologie und Pathogenität

Systematisch gehört *S. pneumoniae* zur Gruppe der oralen Streptokokken innerhalb der Gattung *Streptococcus* (aus dem Griechischen: streptos: gewunden, coccus: Korn), welche wiederum der Familie der *Streptococcaceae*, der Ordnung der *Lactobacillales* (Milchsäurebakterien) und aufgrund des niedrigen GC-Gehalts (unter 50 Molprozent (mol%)) dem Clostridium-Zweig der Gram-positiven Bakterien zugeordnet wird (Schleifer und Ludwig, 1995). Die Gattung setzt sich aus einer

Vielzahl heterogener Arten zusammen, die in Verbindung mit Tier oder Mensch anzutreffen sind, wo sie als Kommensale oder Pathogene auftreten. Die kommensalen Streptokokken, zu denen unter anderem *S. mitis*, *S. oralis* und der Karieserreger *S. mutans* gehören, besiedeln als Teil der normalen Flora die Mundhöhle, Atemwege, den Verdauungs- und Urogenitaltrakt und die Haut des Menschen. Fast alle Kommensalen sind als opportunistische Krankheitserreger bekannt. Als wichtigste humanpathogene Streptokokken sind *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *S. agalactiae* zu nennen (Hardie und Whiley, 1995; Patterson, 1991).

Streptokokken sind runde bis ovoide, unbewegliche, nicht-sporulierende Bakterien, die meist in Paaren oder unterschiedlich langen Ketten wachsen. Der Zelldurchmesser beträgt je nach Art 0,5 bis 1,5 μm . Die Mitglieder dieser Gattung sind fakultative bzw. aerotolerante Anaerobier, bilden keine Katalase und weisen einen homofermentativen Stoffwechsel mit Milchsäure als Hauptprodukt auf. Für das Wachstum benötigen diese Bakterien ein komplexes Nährmedium, das neben einer Kohlenstoffquelle auch Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine, Cholin und Vitamine enthält. Das Wachstum auf Festmedien erfordert den Zusatz von nativem Eiweiß, z. B. in Form von Blut oder Serum (Hardie und Whiley, 1995). Das Temperaturoptimum liegt bei 37 °C.

Die Klassifizierung der Gattung *Streptococcus* erwies sich aufgrund ihrer großen Heterogenität als problematisch und ist nach wie vor nicht zufriedenstellend gelöst. Ein typisches Merkmal von Streptokokken ist die Hämolyse auf bluthaltigen Festmedien, wobei das Hämolyseverhalten schon früh zur Differenzierung verwendet wurde (Brown, 1919). Es werden drei verschiedene Formen unterschieden: Bei der β -Hämolyse sind die Bakterienkolonien durch die Lyse der Erythrozyten und den Abbau des Hämoglobins von einer Zone vollständiger Klärung umgeben. Eine Vergrünung des Mediums um die Kolonien zeichnet die α -Hämolyse aus, die durch eine unvollständige Lyse der Erythrozyten hervorgerufen wird („viridans“ oder „vergrünende“ Streptokokken). Hierbei kommt es lediglich zu einer durch H_2O_2 verursachten Umwandlung von Hämoglobin zu Methämoglobin oder Biliverdin-ähnlichen Verbindungen. H_2O_2 entsteht unter aeroben Bedingungen aus Sauerstoff durch das Enzym Pyruvat-Oxidase (SpxB). Als γ -Hämolyse wird ein Fehlen von hämolytischer Aktivität bezeichnet. Neben dem Hämolyseverhalten werden spezifische Zellwand- bzw. Oberflächenantigene, welche mit entsprechenden Antiseren nachgewiesen werden können, zur Klassifizierung der Gattung herangezogen. Die Einteilung erfolgt hierbei in sogenannte Lancefield-Gruppen, die wiederum in Serotypen unterteilt werden (Lancefield, 1933). Aufgrund der mit beiden Methoden verbundenen nur unzureichenden Erfassung einzelner Arten bzw. nicht immer eindeutigen Differenzierung wird heutzutage vielfach auf wesentlich genauere molekularbiologische Methoden zur Klassifizierung zurückgegriffen. Zusätzlich finden weiterhin die klassischen phänotypischen und physiologischen Methoden Anwendung. *S. pneumoniae* wird hauptsächlich durch zwei physiologische Merkmale von anderen Streptokokken unterschieden: zum einen durch die Lyse der Zellen in Gegenwart von Gallensalzen (Neufeld *et al.*, 1928) oder Detergentien, zum anderen durch die Sensitivität gegenüber Optochin (Ethylhydrocuprein)

(Bowers und Jeffries, 1955). Pneumokokken sind primär α -hämolsierend, können unter anaeroben Bedingungen aber auch eine β -Hämolyse zeigen (Clark, 1986).

Bereits kurz nach der Geburt kommt ein Großteil der Bevölkerung mit *S. pneumoniae* in Berührung. Als Kommensale besiedelt das Bakterium die Schleimhäute des menschlichen Hals-, Nasen- und Rachenraums. Bei bis zu 60 % der Bevölkerung bleibt diese Besiedlung ohne weitere Folgen. Bei immungeschwächten Menschen, älteren Menschen und Kindern, deren Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist, kann *S. pneumoniae* jedoch als opportunistischer Krankheitserreger auftreten und die in 1.1.1 genannten Krankheiten hervorrufen. Eine ganze Reihe von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren sind dabei von großer Bedeutung. Den wohl wichtigsten stellt allerdings die Polysaccharidkapsel dar, welche Schutz vor Phagozytose durch das menschliche Immunsystem verleiht (Musher *et al.*, 2000). Aufgrund der Variabilität der Kapselpolysaccharide lassen sich derzeit 91 verschiedene Serotypen unterscheiden (Bentley *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007). Von diesen sind folgende wegen ihrer hohen Penicillin-Resistenz und ihres weltweiten Auftretens von besonderer klinischer Relevanz: der 23F-, 19F-, 6B- und 9V-Serotyp aus Spanien und der 19A-Serotyp aus Ungarn (Muñoz *et al.*, 1992b; Sibold *et al.*, 1992).

1.2 β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*

Die bakterielle Zellwand stellt als für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität und physiologischer Prozesse essentielle Strukturkomponente einen hervorragenden Angriffspunkt für eine ganze Reihe von Antibiotika dar. Hierzu zählt auch die Gruppe der β -Laktame, deren bekanntester Vertreter wohl das Penicillin G (Benzylpenicillin) ist. Die Entwicklung von β -Laktam-Resistenz in Bakterien ist fast so alt wie die klinische Verwendung dieser Antibiotikaklasse. Dabei haben sich drei verschiedene Mechanismen ausgebildet: Erstens die Produktion von β -Laktamasen, die das Antibiotikum inaktivieren; zweitens die Modifizierung der Penicillin-Bindeproteine (PBP), der Targetstrukturen der β -Laktame, die zur Affinitätsniedrigung gegenüber β -Laktamen führt (intrinsische Resistenz) und drittens eine Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran für β -Laktame. In *S. pneumoniae* basiert die Entwicklung von β -Laktam-Resistenz auf der Veränderung der PBP.

1.2.1 Peptidoglykan – Die bakterielle Achillesferse in der Zellwand

Das Grundgerüst der bakteriellen Zellwand bildet das ausschließlich bei Bakterien anzutreffende Peptidoglykan (Murein), ein Heteropolymer aus den Zuckerderivaten N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure mit über deren D-Laktylgruppe gebundenem Pentapeptid, die in alternierender Abfolge β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die volle Stabilität der Peptidoglykanstruktur wird erst durch eine Quervernetzung der Pentapeptidstränge über direkte Peptidbindungen oder über Interpeptidbrücken erreicht. Die Aminosäure-Zusammensetzung des

Pentapeptids, sowie die Art und das Ausmaß der Quervernetzung sind bakterienspezifisch. In *S. pneumoniae* besteht das Pentapeptid aus L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin und zwei endständigen D-Alanin-Resten. Die Pentapeptidstränge werden entweder direkt über eine Peptidbindung oder indirekt über eine Interpeptidbrücke (L-Alanyl-L-Serin oder L-Alanyl-L-Alanin) zwischen dem L-Lysin und dem vierten D-Alanin des benachbarten Stranges quervernetzt; das fünfte D-Alanin wird dabei abgespalten, wodurch Energie für diese Reaktion geliefert wird (Abb. 1.1) (Goffin und Ghuysen, 2002; Severin und Tomasz, 2000; Vollmer, 2007b). Auch hier existieren wiederum Unterschiede in dem Grad der Verzweigung und Vernetzung der Peptide zwischen verschiedenen Pneumokokken-Stämmen. So wird speziell in resistenten Stämmen ein stark verzweigtes und vernetztes Murein vorgefunden (García-Bustos und Tomasz, 1990; García-Bustos *et al.*, 1988; Severin und Tomasz, 1996; Severin *et al.*, 1995). Darüber hinaus können strukturelle Modifikationen der Glykanstränge auftreten, wie etwa eine N-Deacetylierung, O-Acetylierung oder N-Glykolation. Diese Modifikationen stellen einen Resistenzmechanismus gegenüber der Immunabwehr des Wirts dar (Vollmer, 2008).

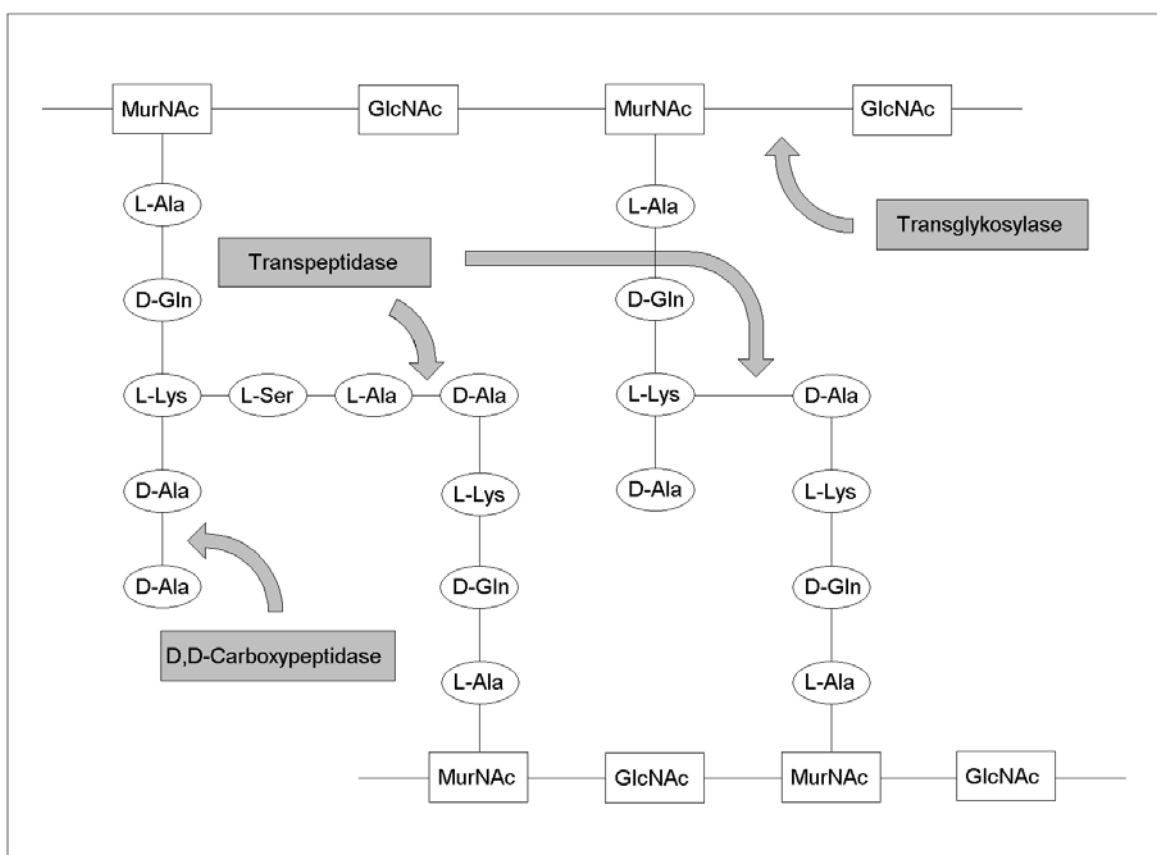


Abb. 1.1: Grundstruktur des Peptidoglykans in *Streptococcus pneumoniae* und die von Penicillin-Bindeproteinen katalysierten Reaktionen.

Das Rückgrat des Peptidoglykans bilden die Zuckerderivate N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) mit Pentapeptid, die in alternierender Abfolge β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Pentapeptidstränge sind in *S. pneumoniae* entweder über eine direkte Peptidbindung oder über eine Interpeptidbrücke quervernetzt. Die drei von PBP katalysierten Reaktionen (siehe 1.2.2) sind durch graue Pfeile gekennzeichnet: Transpeptidierung, Transglykosylierung, D,D-Carboxypeptidierung.

Die Pneumokokken-Zellwand besteht wie die aller Gram-positiver Bakterien aus einer mehrlagigen Peptidoglykanschicht mit daran gebundenen bzw. darin eingebetteten Teichonsäuren (Teichoic Acids, TAs), Proteinen und Kapsel-Polysacchariden. Die Hauptkomponenten sind dabei das Peptidoglykan und die TAs, welche beide in etwa gleichen Anteilen in der Zellwand von *S. pneumoniae* vorhanden sind (Mosser und Tomasz, 1970). TAs sind anionische Phosphodiesterhaltige Polymere, welche bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Neuhaus und Baddiley, 2003): Bindung von Kationen (Kationen-Homöostase) und Oberflächenproteinen (Briese und Hakenbeck, 1985; Hughes *et al.*, 1973; Jonquieres *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 1975), Autolyse (Tomasz, 1968; Wecke *et al.*, 1997), Kompetenz (Tomasz, 1968; Zhang *et al.*, 1999), Virulenz (Abachin *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2002; Poyart *et al.*, 2003), Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden (Kovács *et al.*, 2006; Peschel *et al.*, 1999; Peschel *et al.*, 2000), Säuretoleranz (Boyd *et al.*, 2000), Adhäsion (Abachin *et al.*, 2002; Weidenmaier *et al.*, 2004), Biofilmbildung (Gross *et al.*, 2001), Stimulation der Immunantwort (Grangette *et al.*, 2005; Morath *et al.*, 2001), Proteinsekretion (Nouaille *et al.*, 2004). Sie können kovalent gebunden an das Peptidoglykan vorkommen (Wandteichonsäuren, Wall Teichoic Acids, WTAs) oder aber über einen Lipidanker in der Cytoplasmamembran verankert sein (Lipoteichonsäuren, Lipoteichoic Acids, LTAs). Dabei wird die TA-Fraktion von *S. pneumoniae* aus 90 % WTAs und 10 % LTAs gebildet und unterscheidet sich in drei wichtigen Punkten von der anderer Gram-positiver Bakterien: Erstens, besitzen WTAs und LTAs eine identische chemische Zusammensetzung, zweitens, ist die Struktur der sich wiederholenden Einheiten der TAs von ungewöhnlich chemischer Komplexität und drittens sind beide Polymere mit dem Aminoalkohol Cholin substituiert, welcher überwiegend in Eukaryoten und nur selten in Bakterien vorzufinden ist und im Wachstumsmedium präsent sein muß (Fischer, 1997; Fischer *et al.*, 1993; García *et al.*, 1998; Rane und Subbarow, 1940; Tomasz, 1967). Bestandteil der TAs in *S. pneumoniae* sind zwei bis acht sich wiederholende Tetrasaccharid-Ribitolphosphat-Einheiten, die sich wie folgt zusammensetzen: Glc-AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP (Glc: D-Glukose, AATGal: Aminosucker 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galaktose, GalNAc: N-Acetylgalaktosamin, RitP: Ribitol-5-phosphat) (Behr *et al.*, 1992; Fischer, 1997; Fischer *et al.*, 1993). Die einzelnen Einheiten sind jeweils über eine Phosphodiester-Bindung zwischen Ribitol-5-phosphat und Glukose miteinander verbunden. Zudem können sie über die beiden GalNAc-Reste mit bis zu zwei Phosphorylcholin-Resten substituiert sein, welche für die nicht-kovalente Bindung der sogenannten Cholin-Bindeproteine (CBP) an die TAs benötigt werden (Fischer, 1997). Diese Pneumokokken-spezifischen Zelloberflächenproteine interagieren über einen C-terminalen, Prolin-reichen repetitiven Bereich (Cholin-Bindedomäne) mit den Phosphorylcholin-Resten. Die Interaktion ist für die *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität dieser Proteine erforderlich (García *et al.*, 1998; López und García, 2004; Yother und White, 1994). Zu den CBP in *S. pneumoniae* gehören unter anderem die Zellwand-Hydrolasen LytA, LytB, LytC,

CbpD, die Deacetylase PgdA, das funktionell uncharakterisierte PcpA, sowie die Virulenzfaktoren CbpA und PspA.

Die N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase LytA repräsentiert das Hauptautolysin in Pneumokokken und ist sowohl an der für Laborkulturen typischen stationären Phasen-Autolyse (García *et al.*, 1986; Höltje und Tomasz, 1976), als auch an der im Rahmen der natürlichen genetischen Kompetenz auftretenden Allolyse (siehe 1.4) (Guiral *et al.*, 2005) beteiligt. Als Amidase spaltet dieses Enzym die Amidbindung zwischen der Laktylgruppe der N-Acetylmuraminsäure und der ersten Aminosäure der Peptidseitenkette (L-Alanin), was die Freisetzung des Peptids von dem Glykanstrang und die Lyse der Zellen zur Folge hat. Von LytA wird aufgrund des Fehlens einer N-terminalen Signalsequenz eine cytoplasmatische Lokalisation vermutet, womit aber ungeklärt bleibt, wie dieses Enzym sein extracytoplasmatisches Substrat erreicht. LytA liegt in der Zellwand zunächst in einer inaktiven Form vor (E-Form), welche durch Dimerisierung, hervorgerufen durch die Bindung von zwei Cholinresten der WTAs, in die enzymatisch aktive C-Form übergeht (García *et al.*, 1987; Höltje und Tomasz, 1976; Tomasz und Westphal, 1971; Usobiaga *et al.*, 1996). Diese Bindung und damit Aktivierung kann durch die Zugabe eines Überschusses an Cholin (2 %) oder von mit Cholin substituierten LTAs inhibiert werden (Briese und Hakenbeck, 1983, 1985).

1.2.2 Penicillin-Bindeproteine – Die Targets von β -Laktamen

Die Peptidoglykanbiosynthese ist ein komplexer Prozess, welcher mehr als 20 verschiedene Reaktionsschritte umfasst. Sie beginnt im Cytoplasma mit der Bildung des löslichen Vorläufermoleküls UDP-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid, katalysiert von sechs Mur-Enzymen (MurA bis MurF). Dieses Molekül wird zur Cytoplasmamembran transportiert und dort auf den Lipidcarrier Undekaprenylphosphat (Baktoprenol) übertragen, wodurch Lipid I (Undekaprenylpyrophosphoryl-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid) entsteht. Aus diesem wird wiederum durch Verknüpfung mit N-Acetylglukosamin Lipid II (Undekaprenylpyrophosphoryl-N-Acetylmuraminsäure-N-Acetylglukosamin-Pentapeptid) gebildet. Nachdem die Aminosäurereste der Interpeptidbrücke durch die Enzyme FibA (MurM) und FibB (MurN) angefügt sind (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000), wird der Disaccharid-Heptapeptid-Komplex schließlich durch einen noch unklaren „Flippase“-Mechanismus von der cytoplasmatischen zur periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran transportiert und durch Transglykosylierungs- und Transpeptidierungsreaktionen in die bestehende Zellwand eingebaut (Barreteau *et al.*, 2008; Bouhss *et al.*, 2008).

Die Polymerisierung der Glykanstränge (Transglykosylierung) und Quervernetzung der Peptidseitenketten von benachbarten Glykansträngen (Transpeptidierung) wird durch die PBP katalysiert (siehe Abb. 1.1). PBP sind in allen Peptidoglykan-bildenden Eubakterien vorhanden, wobei jede Bakterienspezies über ein für sie charakteristisches Set dieser chromosomal codierten, membranassoziierten Proteine verfügt. Bei PBP handelt es sich um Multidomänen-Proteine, denen eine

Penicillin-Binde-Domäne (Transpeptidase-Domäne) mit einem Serin im aktiven Zentrum gemein ist. Diese Domäne enthält drei konservierte Sequenzmotive: die SXXK-Box mit dem aktiven Serin, die SXN- und die KT(S)G-Box, wobei X für eine variable Aminosäure steht. Die drei Homologieboxen sind auch bei β -Laktamasen zu finden, die aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten zusammen mit den PBP in die Superfamilie der Penicillin-erkennenden Acyl (Penicilloyl) -Serin-Transferasen eingeordnet werden (Ghuysen, 1991). PBP werden nach ihrem Molekulargewicht, Sequenz- und Strukturvergleichen, sowie enzymatischen Studien in hochmolekulare (high molecular weight, hmw) und niedermolekulare (low molecular weight, lmw) PBP unterteilt. Basierend auf der Domänenstruktur und der katalytischen Aktivität der N-terminalen Domäne können bei den hmw PBP nochmals zwei Klassen unterschieden werden: Klasse A und B (Goffin und Ghuysen, 1998, 2002; Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer Fähigkeit β -Laktame kovalent zu binden, lassen sich PBP nach Inkubation von Zelllysaten mit einem radioaktiven oder fluoreszierenden β -Laktam-Derivat, anschließender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradio- oder Fluorographie relativ einfach visualisieren. Dabei werden sie nach ihrem Molekulargewicht in abnehmender Reihenfolge durchnummeriert (Rutschmann *et al.*, 2007).

S. pneumoniae verfügt über sechs PBP: die hmw PBP der Klasse A, PBP1a (97,7 kDa), PBP1b (89,6 kDa) und PBP2a (80,8 kDa); die hmw PBP der Klasse B, PBP2x (82,3 kDa) und PBP2b (74,5 kDa); und das lmw PBP3 (45,2 kDa). Die hmw PBP sind über einen kurzen N-terminalen hydrophoben Transmembranbereich in der Cytoplasmamembran verankert. Neben der Penicillin-Binde-Domäne besitzen sie noch eine extracytoplasmatische N- und C-terminale Domäne (Abb. 1.2). Bei den hmw PBP der Klasse A (bifunktionelle Enzyme) zeigt die N-terminale Domäne eine Transglykosylase-Aktivität; bei den hmw PBP der Klasse B (monofunktionelle Enzyme) ist die Funktion der N-terminalen Domäne noch unbekannt. Das lmw PBP3 wird mit Signalpeptid synthetisiert, N-terminal prozessiert und über eine C-terminale amphiphile Helix mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Es weist neben der Penicillin-Binde-Domäne eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion auf (Denapaite *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den übrigen PBP, welche die Formation von D,D-Quervernetzungen katalysieren, fungiert PBP3 als D,D-Carboxypeptidase, d. h., es spaltet die endständige D-Alanin-D-Alanyl-Bindung in den Pentapeptiden unter Bildung von Tetrapeptiden, welche in Pneumokokken weiter zu Tripeptiden getrimmt werden. Dadurch kann die Anzahl der für die Transpeptidierungsreaktion zur Verfügung stehenden Pentapeptid-Einheiten limitiert und somit der Grad der Quervernetzung reguliert werden (Hakenbeck und Kohiyama, 1982; Morlot *et al.*, 2004; Severin *et al.*, 1992).

Da Versuche Deletions- bzw. Inaktivierungsmutanten von PBP2x und PBP2b zu erhalten, fehlgeschlugen, wird davon ausgegangen, dass beide für *S. pneumoniae* essentiell sind (Kell *et al.*, 1993). Weiterhin haben Inaktivierungsstudien ergeben, dass PBP1a, PBP1b und PBP2a individuell gesehen nicht essentiell sind, für das Wachstum aber entweder PBP1a oder PBP2a erforderlich ist

(Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). PBP3 kann inaktiviert werden, was darauf schließen lässt, dass es entbehrlich ist (Hakenbeck *et al.*, 1993; Schuster *et al.*, 1990).

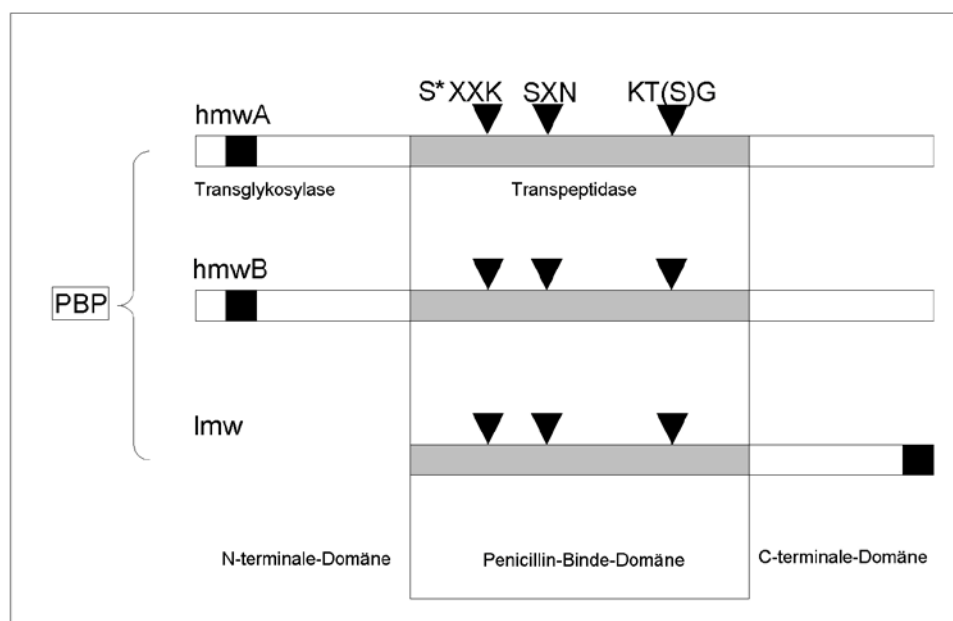


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der Penicillin-Bindeproteine von *Streptococcus pneumoniae*.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der hmw PBP der Klasse A und B und des lmw PBP von *S. pneumoniae*. Die Domänenstruktur der PBP ist durch Balken angedeutet, wobei der mittlere graue Balken die Penicillin-Binde-Domäne kennzeichnet. Die Lage der drei konservierten Boxen (SXXK, SXN und KT(S)G) innerhalb dieser Domäne ist durch schwarze Dreiecke oben markiert. Der kurze schwarze Block am linken Ende symbolisiert jeweils den N-terminalen hydrophoben Transmembranbereich, der als Membrananker für die hmw PBP fungiert. Die Membranassoziation des lmw PBP hingegen erfolgt über eine C-terminale amphiphile Helix, die als schwarzer Block am rechten Ende angegeben ist. Alle PBP verfügen über eine Transpeptidase-Aktivität in der Penicillin-Binde-Domäne; die hmw PBP der Klasse A weisen zusätzlich eine Transglykosylase-Aktivität in der N-terminalen Domäne auf (nach Hakenbeck, 1998).

Abk.: S* (aktives Serin)

Von fünf PBP liegt bereits die Kristallstruktur vor: PBP1a, PBP1b, PBP2x, PBP2b und PBP3 (Contreras-Martel *et al.*, 2009; Contreras-Martel *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2005; Morlot *et al.*, 2005; Pares *et al.*, 1996). Die genauen Funktionen der einzelnen PBP sind noch weitgehend unerforscht; anhand Inaktivierungsanalysen und Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden jedoch Hinweise erhalten. So wird angenommen, dass PBP1a, PBP2x und PBP1b an dem septalen Zellwandwachstum (Zellteilung) beteiligt sind, während PBP2a, PBP2b und PBP1b in das periphere bzw. äquatoriale Wachstum (Zell-elongation) involviert sind (Morlot *et al.*, 2003). PBP3 ist über die gesamte Zelloberfläche verteilt und scheint für die richtige Platzierung der Teilungsebene und Koordination des Zellteilungsprozesses verantwortlich zu sein (Morlot *et al.*, 2004).

1.2.3 β -Laktame – Eine Waffe wird stumpf

... Pneumo bites back ...

Die Behandlung von Pneumokokken-Infektionen erfolgt vornehmlich mit β -Laktam-Antibiotika, da diese Bakterien eine natürlich hohe Suszeptibilität gegenüber diesen Antibiotika zeigen. Die β -Laktam-Gruppe zählt zu den wichtigsten Antibiotikaklassen in der Medizin und geht auf das Penicillin zurück, das der englische Bakteriologe Alexander Fleming 1928 aus Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* extrahierte. Ihren Namen verdankt diese Gruppe dem charakteristischen viergliedrigen β -Laktam-Ring. Zu den β -Laktamen gehören die Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobaktame und β -Laktamase-Inhibitoren wie die Clavame. Produzenten sind Schimmelpilze der Gattungen *Penicillium*, *Cephalosporium* und *Aspergillus* sowie bestimmte Prokaryoten.

Die bakteriozide Wirkung von β -Laktam-Antibiotika beruht auf der Inhibition der Transpeptidierungs- und Carboxypeptidierungsreaktion der PBP. Dabei fungieren β -Laktame als Strukturanaloga des natürlichen Substrates der PBP, des D-Alanyl-D-Alanin-Restes der zu verknüpfenden Pentapeptid-Einheit. Das Antibiotikum bindet unter Öffnung des β -Laktam-Rings kovalent an den Hydroxylrest des Serins im aktiven Zentrum (daher auch der Name „Penicillin-Bindeproteine“), wobei ein stabiler, langlebiger Acyl-Enzym-Komplex (Penicilloyl- bzw. Cephalosporyl-Enzym-Komplex) entsteht, in dem das PBP in enzymatisch inaktiver Form vorliegt und nicht mehr für die Peptidoglykanbiosynthese zur Verfügung steht (Tipper und Strominger, 1965). Die Zellwand wird zwar weiterhin gebildet, aber nicht mehr quervernetzt und verliert dadurch erheblich an Stabilität. Zusätzlich kommt es über einen noch nicht verstandenen Mechanismus zu einer unkontrollierten Freisetzung von Autolysinen, welche die bestehende Zellwand verdauen und weiter schwächen (Tomasz, 1979). Die Bakterien lysieren letztendlich durch den osmotischen Druckunterschied zwischen dem Zellinneren und der äußeren Umgebung. Demnach können β -Laktame also nur bei Bakterien wirken, die sich im Zustand der Teilung befinden und eine neue Zellwand ausbilden müssen.

Aufgrund des seit fast 70 Jahren andauernden Selektionsdrucks der β -Laktam-Anwendung auf Pneumokokken haben sich PBP mit einer geringen Affinität für diese Antibiotika entwickelt. Die Enzyme werden durch Mutationen so verändert, dass β -Laktame nicht mehr oder nur noch mit deutlich verminderter Affinität gebunden werden, die Aktivität bezüglich des eigentlichen Substrates aber unbeeinflusst bleibt. Eine solche Veränderung ist also kein triviales Unterfangen – immerhin ist die durch PBP katalysierte Reaktion essentiell. Niederaffine PBP werden bei weitaus höheren Antibiotikakonzentrationen gehemmt als unveränderte PBP; die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist erhöht. Bisher wurden ausschließlich in der Penicillin-Binde-Domäne

Mutationen gefunden, die ausschlaggebend für die β -Laktam-Resistenz sind. Dabei unterscheidet sich die Art der Mutationen in klinischen Isolaten und Labormutanten von *S. pneumoniae* (Denapaite *et al.*, 2007).

1.2.4 Penicillin-Bindeproteine als Resistenzdeterminanten in klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae*

In resistenten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* treten niederaffine PBP mit Mosaikstrukturen auf, bei denen ganze Sequenzbereiche durch homologe Sequenzen ersetzt sind, die sich in bis zu 25 % auf Nukleotid- und etwa 10 % auf Aminosäureebene von den korrespondierenden Sequenzen sensibler Stämme unterscheiden (Dowson *et al.*, 1989a; Dowson *et al.*, 1989b; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992). Es wird angenommen, dass solche Mosaikgene das Resultat von Gentransfer- und Rekombinationsereignissen zwischen *S. pneumoniae* und kommensalen Streptokokken-Arten sind. Da die kommensale Flora jede Antibiotika-Therapie ihres Wirts durchlebt, konnten sehr schnell resistente Stämme entstehen, die zunächst aufgrund fehlender Beachtung unbemerkt blieben. Demnach entwickelte sich β -Laktam-Resistenz vermutlich über die Ansammlung spontaner Punktmutationen in den PBP-Genen kommensaler Streptokokken, bevor Resistenz-relevante Sequenzbereiche mittels horizontalem Gentransfer auf Pneumokokken übertragen wurden, wo es zu sekundären Mutationen kam (Dowson *et al.*, 1993; Sibold *et al.*, 1994). So wurden in resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten Mosaikblöcke in *pbp1a*, *pbp2x* und *pbp2b* gefunden, deren Nukleotidsequenz homolog zu den entsprechenden Sequenzen von β -Laktam-sensitiven und -resistenten *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguinis*-Isolaten ist. Darüber hinaus deutet die Tatsache, dass identische *pbp1a*-, *pbp2x*- und *pbp2b*-Mosaikgene in genetisch verschiedenen *S. pneumoniae*-Klonen vorkommen auch auf einen Gentransfer innerhalb der Art hin (Coffey *et al.*, 1991). Analysen von *pbp2x*, von dem die Sequenzinformation sehr vieler Isolate vorliegt, lassen darauf schließen, dass ein globaler Genpool von Resistenzdeterminanten existiert, der sowohl kommensalen als auch pathogenen Streptokokken zur Verfügung steht (Chalkley *et al.*, 1991; Dowson *et al.*, 1993; Dowson *et al.*, 1989a; Dowson *et al.*, 1989b; Dowson *et al.*, 1990; Potgieter und Chalkley, 1995; Reichmann *et al.*, 1997; Sibold *et al.*, 1994).

In resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten sind von vier der fünf hmw PBP niederaffine Formen beschrieben worden: PBP1a, PBP2x, PBP2a und PBP2b (Dowson *et al.*, 1989a; Dowson *et al.*, 1989b; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992). Dabei dienen PBP2x und PBP2b als primäre Targets der meisten β -Laktame und werden somit als erstes verändert. Niederaffine Formen dieser beiden PBP tragen jeweils zu einer relativ geringen Resistenzerhöhung bei (primäre Resistenzerhöhung) und sind Voraussetzung für hohe β -Laktam-Resistenz, die durch zusätzliche Veränderungen von Klasse A PBP, wie PBP1a erreicht wird (sekundäre Resistenzerhöhung) (Barcus *et al.*, 1995; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Hakenbeck *et al.*, 1994; Krauß *et al.*,

1996; Laible und Hakenbeck, 1991; Muñoz *et al.*, 1992a; Sifaoui *et al.*, 1996). Eine auffallende Eigenschaft von PBP2b ist eine hohe Reaktivität gegenüber Penicillinen, aber keine Interaktion mit Cephalosporinen der dritten Generation wie dem Cefotaxim (Hakenbeck *et al.*, 1987). Für diese Gruppe von β -Laktamen stellt PBP2b somit kein Target dar und ist demnach auch nicht an der Resistenzbildung gegenüber diesen Antibiotika beteiligt. Da hierfür alleine Veränderungen in PBP2x und PBP1a ausreichen, läßt der Einsatz von Cefotaxim eine sehr viel schnellere Resistenzentwicklung erwarten (Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992a; Reichmann *et al.*, 1996; Smith und Klugman, 1998). Hinzu kommt, dass Cephalosporine der dritten Generation eine tolerante Antwort hervorrufen, d. h., die Bakterien werden zwar in ihrem Wachstum gehemmt, lysieren aber nicht wie es bei der Behandlung mit anderen β -Laktamen der Fall ist. Offensichtlich ist eine Inhibition von PBP2b also Voraussetzung für die β -Laktam-induzierte Lyse (Hakenbeck *et al.*, 1987). Entsprechend reagieren Pneumokokken-Stämme mit niederaffinen PBP2b-Varianten mit einer dramatisch reduzierten Lyse, eine Eigenschaft, welche erheblich zur längeren Persistenz und besseren Verbreitung solcher Stämme beiträgt (Grebe und Hakenbeck, 1996; Liu und Tomasz, 1985; Reichmann *et al.*, 1997).

Die Rolle von PBP2a und PBP3 bei der β -Laktam-Resistenz in klinischen Isolaten ist noch weitgehend unklar, wobei niederaffine Varianten von PBP2a gelegentlich in hochresistenten Pneumokokken-Stämmen zu verzeichnen sind (du Plessis *et al.*, 2000; Hakenbeck *et al.*, 1998; Sanbongi *et al.*, 2004). Ein niederaffines PBP1b wurde bisher nur in *S. pneumoniae*-Stämmen beobachtet, die mit chromosomaler DNA eines hochresistenten *S. mitis*-Isolats transformiert wurden (Hakenbeck *et al.*, 1998).

1.2.5 Penicillin-Bindeproteine als Resistenzdeterminanten in Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae*

Resistente Labormutanten von *S. pneumoniae* weisen niederaffine PBP mit Punktmutationen auf, welche sich im Labor relativ leicht mit dem entsprechenden β -Laktam selektionieren lassen. Die Entstehung von β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* stellt einen in mehreren Schritten ablaufenden Prozess dar, bei dem es zu einer sukzessiven Akkumulation von Punktmutationen in Resistenzdeterminanten kommt. Zur Identifizierung der an dieser Resistenzentwicklung beteiligten Gene und relevanten Mutationen wurden ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Stamm R6 spontanresistente Mutanten mit schrittweise steigenden Konzentrationen der beiden β -Laktam-Antibiotika Cefotaxim und Piperacillin selektioniert. Das Resultat waren mehrere unabhängige Mutanten-Serien (-Familien) aus bis zu sechs Mitgliedern mit steigendem Resistenzniveau. Diese wurden jeweils mit C oder P und drei Zahlen benannt, wobei C bzw. P das Selektionsantibiotikum Cefotaxim bzw. Piperacillin angibt, die erste Zahl den Selektionsschritt und die letzte die Mutanten-Familie (Abb. 1.3) (Laible und Hakenbeck, 1987).

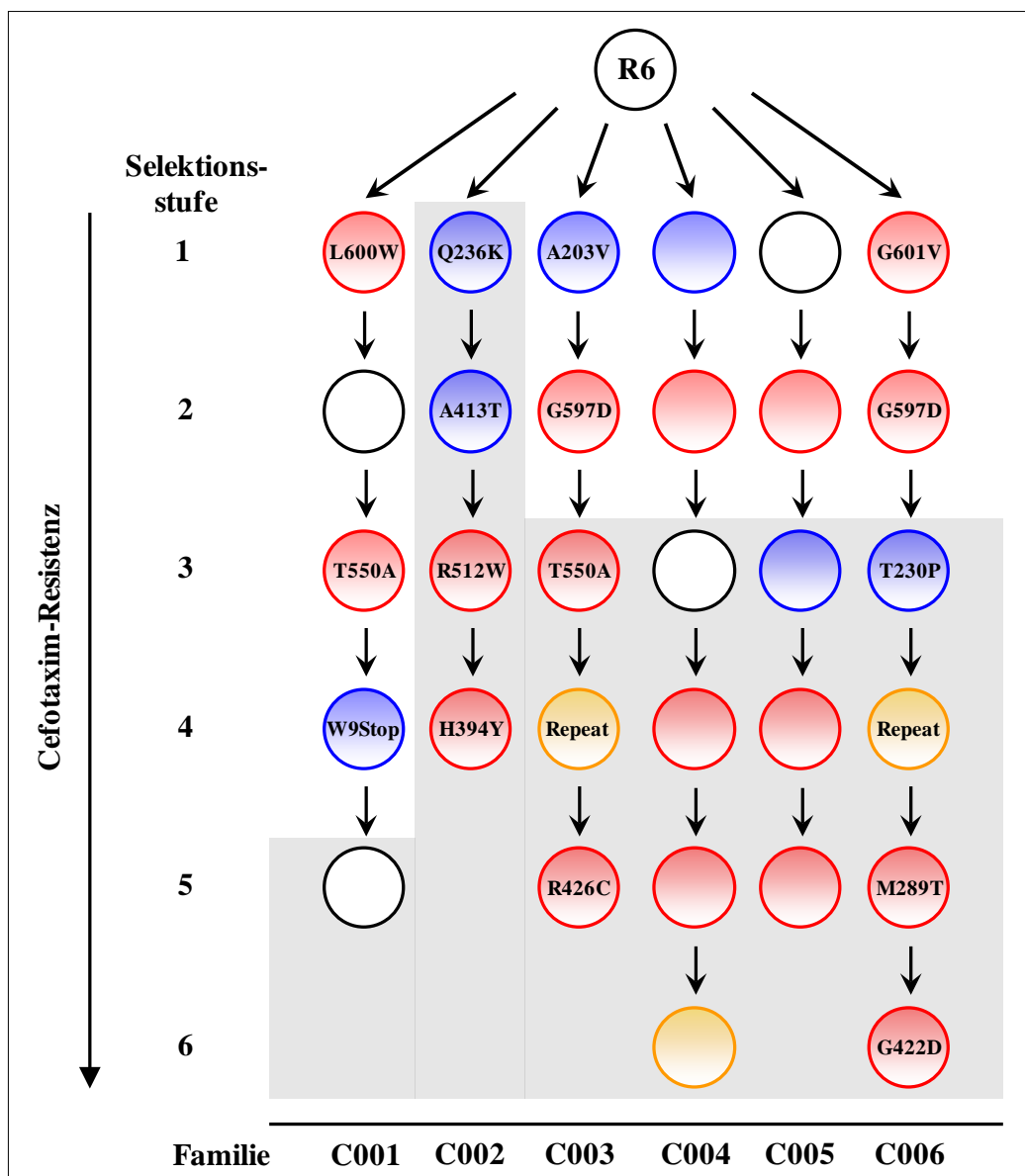


Abb. 1.3: Übersicht über die Familien spontan Cefotaxim-resistenter *Streptococcus pneumoniae*-Mutanten.

Dargestellt sind die sechs Familien spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten (C-Mutanten) und die in den für diese Arbeit relevanten Mitgliedern identifizierten Mutationen. Ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Laborstamm R6 wurden unabhängige Familien von spontanresistenten Mutanten mit schrittweise steigenden Cefotaxim-Konzentrationen selektiert. Dabei ging diese Resistenzhöhung mit einer Akkumulation von Punktmutationen einher, wobei in nahezu allen Fällen ein Selektionsschritt mit dem Auftreten einer Punktmutation in PBP2x oder CiaH korrelierte. Zudem kam es in jeder Familie ab einer bestimmten Stufe zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz. Die Kreise symbolisieren einzelne Mutanten, rote Kreise Mutanten mit PBP2x-, blaue Kreise Mutanten mit CiaH-, orange Kreise Mutanten mit PBP2a- (C503, C604, C406) bzw. PBP3- (C604) und schwarze Kreise Mutanten mit unbekanntem Mutationen. Die jeweilige Punktmutation ist den Kreisen aufgeführt. Der graue Kasten verdeutlicht den in jeder Familie ab einer bestimmten Stufe eintretenden Kompetenzverlust.

Die Charakterisierung der einzelnen Mutanten ergab, dass je nach eingesetztem β -Laktam, verschiedene Gene von Mutationen betroffen waren und dass in nahezu allen Fällen ein Selektionsschritt mit dem Auftreten einer Punktmutation korrelierte. Im Fall der mit Cefotaxim

selektionierten Mutanten wurde PBP2x, bei den mit Piperacillin selektionierten PBP2b als erstes PBP verändert. Während die Selektion mit Cefotaxim bevorzugt Veränderungen in PBP2x, PBP2a und PBP3 bewirkte, waren mit Piperacillin hauptsächlich Mutationen in PBP1a und PBP2b zu beobachten (Krauß und Hakenbeck, 1997; Laible und Hakenbeck, 1991; Laible *et al.*, 1989). Diese Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Affinitäten der PBP für das jeweilige β -Laktam erklären, wobei dasjenige PBP als erstes verändert wird, welches die höchste Affinität für das Selektionsantibiotikum besitzt. Sowohl in den C- als auch in den P-Mutanten traten zusätzlich Resistenz-vermittelnde Mutationen in Nicht-PBP-Genen auf, in ersteren im Gen *ciaH* für die Histidin-Protein-Kinase CiaH des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH (siehe 1.5) (Guenzi *et al.*, 1994), in letzteren in dem Gen *cpoA*, das für die Glykosyltransferase CpoA codiert (Grebe *et al.*, 1997; Volz, 2008). In den Familien beider Mutantenreihen stellte sich ab einer bestimmten Stufe ein Verlust der natürlichen Kompetenz ein, der allerdings durch die Zugabe des Peptid-Pheromons CSP (Competence Stimulating Peptide) komplementiert werden konnte (Zähler *et al.*, 2002). Darüber hinaus war in beiden Reihen die Reduktion der Menge eines bestimmten PBPs bezeichnend: In der C-Reihe handelte es sich um PBP2x, in der P-Reihe um PBP1a (Grebe *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 2008). Die Namensgebung der Nicht-*pbp*-Resistenzdeterminanten CiaRH und CpoA bringen einige der geschilderten Phänotypen zum Ausdruck: Cia ist die Abkürzung für Competence induction and altered cefotaxime susceptibility (Guenzi *et al.*, 1994), CpoA steht für Regulator of Competence and ponA, wobei ponA die ältere Bezeichnung für das *pbp1a*-Gen meint (Grebe *et al.*, 1997).

1.3 PBP2x: Die wichtigste primäre Resistenzdeterminante in *Streptococcus pneumoniae*

... Pneumo has six PBPs and not five ...

Es ist schon eigenartig, dass ausgerechnet dasjenige PBP, welches als letztes entdeckt wurde, die wichtigste primäre Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* darstellt und als Modell-PBP maßgeblich zur Aufklärung der Evolution von β -Laktam-Resistenz in diesem Pathogen beigetragen hat. Die Rede ist von PBP2x, welches zwar als letztes der sechs PBP Mitte der 80er Jahre, als eine bessere Auftrennung dieser Proteine mittels SDS-PAGE erzielt werden konnte, zum Vorschein kam, aber als erstes PBP strukturell entschlüsselt wurde (Hakenbeck *et al.*, 1986; Pares *et al.*, 1996). PBP2x ist ein essentielles hmw PBP der Klasse B mit einer Länge von 750 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 82,3 kDa (Abb. 1.4).

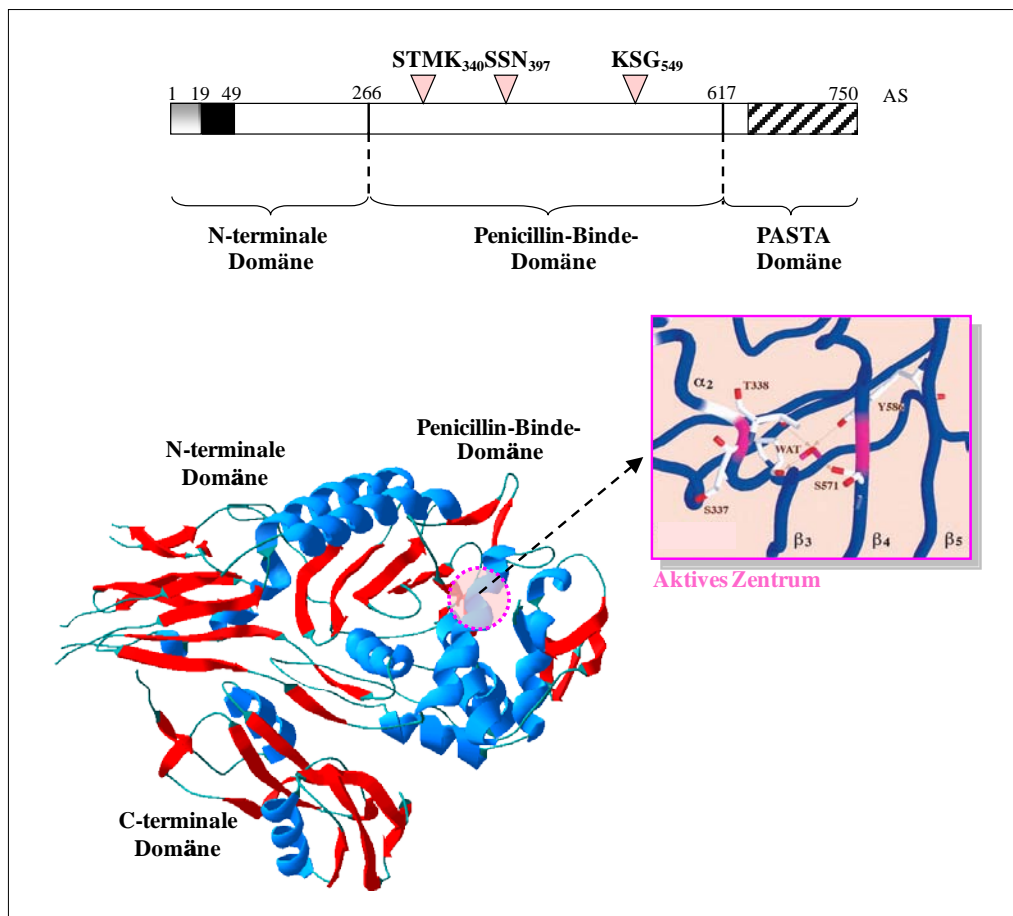


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau und dreidimensionale Struktur des PBP2x von *Streptococcus pneumoniae*.

Gezeigt ist der schematische Aufbau und die dreidimensionale Struktur des PBP2x aus dem β -Laktam-sensitiven Stamm R6. Das Protein besteht aus insgesamt 750 Aminosäuren (AS) und weist eine Drei-Domänenstruktur mit einer zentralen Penicillin-Binde- (AS 266 bis 616), einer N-terminalen (AS 49 bis 265) und einer C-terminalen (AS 635 bis 750) (schraffierter Block) bzw. PASTA-Domäne (AS 617 bis 750) auf. Die cytoplasmatische (AS 1 bis 18) und Transmembran- (AS 19 bis 48) Region in der N-terminalen Domäne sind als grauer und schwarzer Block gekennzeichnet. Die Lage der drei das aktive Zentrum bildenden konservierten Boxen STMK, SSN und KSG innerhalb der Penicillin-Binde-Domäne ist durch rosa Dreiecke markiert. Der Ausschnitt neben der unteren Molekülstruktur zeigt eine „Wurm“-Darstellung der Region um die Position Thr338 in der STMK-Box des aktiven Zentrums (siehe unten). Ein für die Enzymstruktur und -aktivität wichtiges Wassermolekül (WATER, WAT) wird über Wasserstoffbrückenbindungen (rosa Pfeile) mit den Seitenketten der AS Ser571, Thr338, Tyr586 und einem Kohlenstoffatom der Hauptkette von Pro335 koordiniert. Die relevanten Strukturmodule α_2 , β_3 , β_4 und β_5 sind angegeben (Mouz *et al.*, 1998). Die dreidimensionale Struktur von PBP2x wurde mithilfe der unter der Proteindatenbanknummer 1QMF abgelegten Strukturdatei (Gordon *et al.*, 2000) und dem Programm DeepView/Swiss-PdbViewer (Version 3.7, 1995-2001) generiert.

Seine Kristallstruktur bestätigt die komplexe Drei-Domänen-Organisation der hmw PBP mit einer zentralen Penicillin-Binde-Domäne mit Transpeptidase-Aktivität und aktivem Zentrum (Aminosäure 266 bis 616), einer verlängerten „Zucker-Zangen“-förmigen N-terminalen Domäne (Aminosäure 49 bis 265), die in engem Kontakt mit ersterer steht und einer kleinen globulären C-terminalen Domäne (635 bis 750), die über einen flexiblen Loop-Bereich mit der Penicillin-Binde-

Domäne verbunden ist. Ein kurzer hydrophober Transmembranbereich (Aminosäure 19 bis 48) verankert das Protein in der Cytoplasmamembran (Gordon *et al.*, 2000; Pares *et al.*, 1996). Am C-terminalen Ende von PBP2x konnte eine sogenannte PBP And Serin/Threonine Kinase Associated Domain (PASTA-Domäne) identifiziert werden (Aminosäure 617 bis 750), welche aus einer Duplikation des Strukturmotivs $\alpha\beta\beta\beta$ (α -Helix und drei β -Faltblätter) besteht und in den hmw PBP und Eukaryoten-ähnlichen Serin/Threonin-Kinasen vieler Bakterien gefunden wurde. Über die Funktion dieser Domäne liegen noch keine eindeutigen Daten vor (Yeats *et al.*, 2002). Das gilt auch für die N-terminale Domäne, von der aber angenommen wird, dass sie als regulatorische Interaktionsfläche für die Wechselwirkung von PBP2x mit anderen Proteinen innerhalb des Multi-enzymkomplexes der Zellteilungsmaschinerie (dem Divisom) fungiert (Höltje, 1998; Massidda *et al.*, 1998; Pares *et al.*, 1996). Diese Theorie wird durch die „Zucker-Zangen“-Form und die Beobachtung, dass die inneren Bereiche dieser Zange in resistenten Stämmen relativ wenig Mutationen beherbergen, gestützt (Dessen *et al.*, 2001).

Die Entstehung und Ausbreitung von *pbp2x*-Mosaikgenen durch horizontalen Gentransfer zwischen kommensalen Streptokokken und Pneumokokken ist ausführlich untersucht worden und es liegen eine Fülle von Sequenzdaten vor (Chi *et al.*, 2007; Reichmann *et al.*, 1997; Sibold *et al.*, 1994). Die Existenz vieler Varianten von *pbp2x*-Mosaikgenen und die Menge der Punktmutationen in diesen Genen erschweren die Unterscheidung zwischen Mutationen mit Resistenzrelevanz und solchen, die für die Resistenz irrelevant und auf den Ursprung des Gens zurückzuführen sind. Die PBP2x-Sequenzen von resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen: Bei der einen Gruppe ist ein Thr \rightarrow Ala-Austausch an Position 338 in der konservierten S₃₃₇TMK-Box präsent (Dessen *et al.*, 2001); die andere Gruppe ist durch eine Gln \rightarrow Glu-Mutation an Position 552 in der Nähe der konservierten K₅₄₇TG-Box definiert (Pernot *et al.*, 2004), wobei mindestens eine dieser beiden Positionen in den meisten Isolaten mutiert ist (Abb. 1.5). Die beiden Gruppen unterscheiden sich in dem molekularen Mechanismus, welcher der reduzierten Reaktivität des Proteins gegenüber β -Laktamen zugrunde liegt. Bei der ersten Gruppe bringt der Wegfall einer Hydroxylgruppe an Position 338 und des mit dieser über Wasserstoffbrücken verbundenen Wassermoleküls eine Destabilisierung, „offene“ Konformation und letztendlich verminderte β -Laktam-Affinität des aktiven Zentrums mit sich (siehe unten). Bei der zweiten Gruppe verhindert die Einführung einer negativen Ladung an Position 552 die Bindung des negativ geladenen β -Laktam-Antibiotikums an das in einer „geschlossenen“ Konformation vorliegende aktive Zentrum (Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Pernot *et al.*, 2004). Hierbei sei angemerkt, dass auch PBP2x-Sequenzen vorkommen, bei denen beide Mutationen identifiziert werden konnten und die demnach beide Mechanismen vereinen. Eine T338A-Substitution wird insbesondere in hochresistenten Pneumokokken-Stämmen oft in Verbindung mit einem M339F-Austausch angetroffen (Asahi *et al.*, 1999; Chesnel *et al.*, 2003; Coffey *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2002; Reichmann *et al.*, 1997; Sanbongi *et al.*, 2004). Während die

Q552E-Mutation auch im Labor selektioniert werden kann (Sifaoui *et al.*, 1996), tritt eine Punktmutation an Position 338 ausschließlich in klinischen Isolaten auf. In den meisten Fällen ist Thr338 gegen Alanin ausgetauscht, weniger häufig gegen Prolin, Glycin oder Serin (Asahi *et al.*, 1999; Bergmann, 2003; Bicmen *et al.*, 2006; Carapito *et al.*, 2006a; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; du Plessis *et al.*, 2002; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002; Sanbongi *et al.*, 2004; Schmitt, 2004; Smith und Klugman, 2005). Thr338 befindet sich in 10 Å Distanz unmittelbar benachbart zum aktiven Ser337, wobei die Seitenkette des Threonins in einer kleinen Höhle abgewandt vom aktiven Zentrum liegt (Abb. 1.4). Diese Höhle enthält ein für die Struktur und Stabilität von letzterem, sowie die Wechselwirkung mit β -Laktamen wichtiges Wassermolekül, welches über Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen der Seitenketten von Ser571, Thr338, Tyr586 und einem Kohlenstoffatom der Hauptkette von Pro335 koordiniert wird. Dabei hat keiner der Liganden Kontakt zu einem gebundenen Substrat oder Antibiotikum. Der Wegfall der Hydroxylgruppe an Position 338 durch eine Mutation von Threonin zu Alanin, Prolin oder Glycin führt zu einer Destabilisierung der Wasserstoffbrücken in diesem Bereich und zum Verlust des Wassermoleküls. Mouz *et al.*, 1998 postulieren, dass diese lokale Veränderung eine alternative Konformation des aktiven Zentrums begünstigt, die wiederum eine modifizierte katalytische Aktivität zur Folge hat, welche sich in der bereits oben erwähnten reduzierten Affinität gegenüber β -Laktamen äußert. Enzymkinetische Studien mit löslichen PBP2_{xT338}-Derivaten belegen, dass die stärkste Reduktion der Acylierungseffizienz durch Penicillin G und Cefotaxim mit der T338G-Mutation erreicht wird, gefolgt von der T338P- und T338A-Substitution (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998).

Eine besondere Mutation repräsentiert die sowohl in ungewöhnlich hoch Cefotaxim-resistenten klinischen Stämmen als auch in Labormutanten auftretende T550A-Aminosäuresubstitution hinter der konservierten KSG-Box, welche einen starken Anstieg der Cefotaxim-Resistenz, aber gleichzeitig eine Hypersensitivität gegenüber Penicillinen hervorruft (Abb. 1.5). Mit dieser Punktmutation kommt es zu einer Aufhebung zweier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr550 und dem Cephalosporin und damit zur Reduktion der Enzym-Affinität für diese Gruppe von β -Laktamen (Asahi *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991; McDougal *et al.*, 1995; Mouz *et al.*, 1999; Sifaoui *et al.*, 1996).

Es gibt einige Unterschiede bezüglich der Lokalisation und dem Resistenzpotential zwischen im Labor und in der klinischen Umgebung generierten PBP2_x-Mutationen (Abb. 1.5). Erstere konzentrieren sich hinter der konservierten SSN-Box und am C-terminalen Ende der Penicillin-Binde-Domäne und vermitteln hauptsächlich Resistenz gegenüber dem zur Selektion verwendeten β -Laktam. Als Besonderheit manifestiert sich bei zwei von ihnen ein Temperatursensitivitäts-Phänotyp (Krauß *et al.*, 1996). Letztere sind zusätzlich im Bereich der konservierten Boxen angesiedelt und führen aufgrund des größeren Selektionsdrucks zu einer Resistenz gegenüber einem

breiten Spektrum von β -Laktam-Antibiotika (Grebe und Hakenbeck, 1996; Jamin *et al.*, 1993; Laible und Hakenbeck, 1991; Sifaoui *et al.*, 1996).

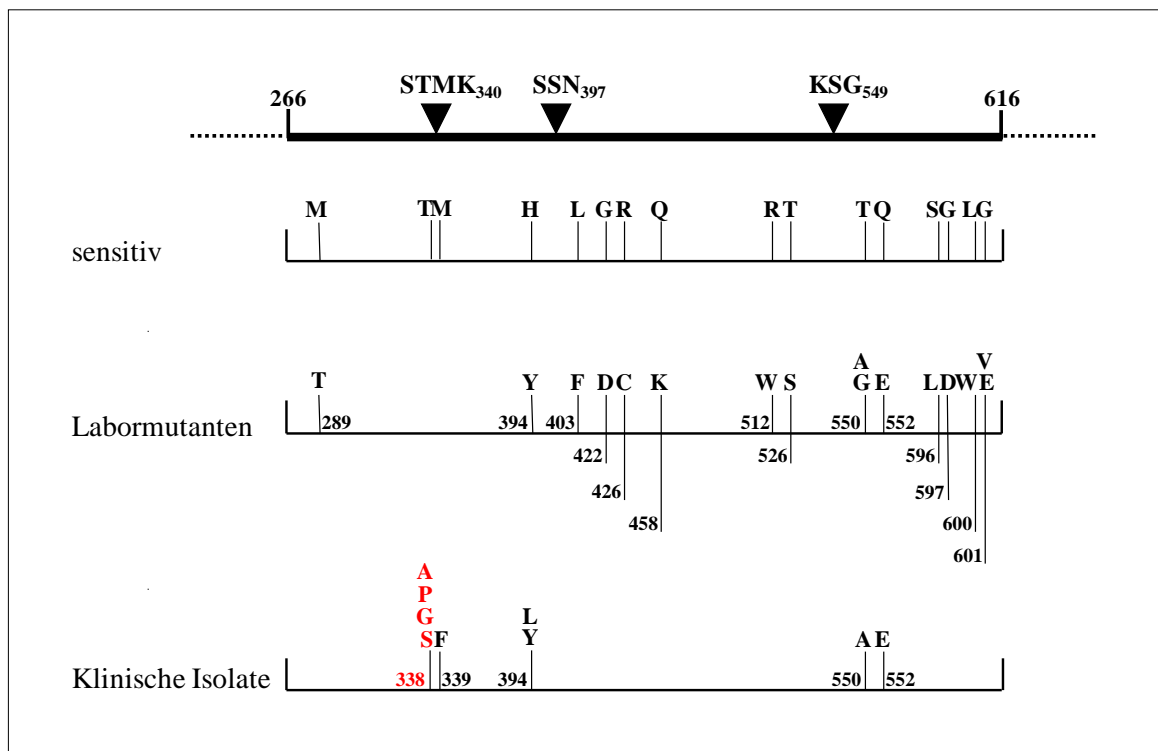


Abb. 1.5: Resistenz-relevante PBP2x-Punktmutationen in Labormutanten und klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae*.

Aufgeführt sind die wichtigsten β -Laktam-Resistenz-relevanten PBP2x-Punktmutationen in spontan Cefotaxim-resistenten Labormutanten (C-Mutanten) (siehe Abb. 1.3 und 1.2.5) und klinischen Isolaten von *S. pneumoniae*. Am oberen Rand ist die Penicillin-Binde-Domäne von PBP2x mit den drei konservierten Boxen STMK, SSN und KSG dargestellt. Darunter sind die Aminosäure-Reste in der Penicillin-Binde-Domäne von sensitiven Stämmen wie R6 angegeben. Die beiden anderen Balken zeigen die an den entsprechenden Positionen auftretenden Substitutionen in Labormutanten (oben) und klinischen Isolaten (unten) mit Positionsangabe. Rot hervorgehoben ist die ausschließlich in klinischen Isolaten anzutreffende Position Thr38, welche eine Schlüsselposition bei der Entstehung von β -Laktam-Resistenz darstellt und im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit stand.

1.4 Das Zwei-Komponenten-System ComDE: Regulator der genetischen Kompetenz in *Streptococcus pneumoniae*

Zwei-Komponenten-Systeme (Two Component Signal Transduction Systems, TCSs) sind regulatorische Funktionseinheiten, die es Bakterien ermöglichen, externe Reize zu detektieren und in eine zelluläre Antwort umzusetzen, um sich damit an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Hakenbeck und Stock, 1996; Parkinson und Kofoid, 1992; Robinson *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 1989). Diese Systeme regulieren viele verschiedene zelluläre Prozesse, wie Antibiotika-Resistenz, -Synthese, Aufnahme und Verwertung von Substraten, Chemotaxis, Detoxifikation, Kompetenz, Osmoregulation, Photosynthese, Sporulation, Transportprozesse,

Virulenz und Zellwand-Integrität (Grebe und Stock, 1999; Hoch, 2000). Der Prototyp eines Zwei-Komponenten-Systems besteht aus zwei modular aufgebauten Protein-Komponenten: einer Cytoplasmamembran-gebundenen Sensor- oder Histidin-Kinase (HK) und einem cytoplasmatischen Response-Regulator (RR). Die HK enthält eine extrazelluläre variable N-terminale Input- oder Sensor-Domäne (SD) und eine cytoplasmatische konservierte C-terminale Transmitter- oder Kinase-Domäne (KD) mit einem Histidin-Rest (Grebe und Stock, 1999). Der RR verfügt über eine konservierte N-terminale Receiver-Domäne (REC-Domäne) (RD) mit einem Aspartat-Rest und eine variable C-terminale Output- oder Effektor-Domäne (OD) (Bourret, 2006; Galperin, 2006). Wird ein Stimulus von der SD der HK perzipiert, kommt es zu einer Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Autophosphorylierung des Histidins der KD. Diese Reaktion erfordert die Dimerisierung zweier HK-Proteine (Homodimer), wobei ein Monomer die Phosphorylierung des anderen katalysiert (*trans*-Reaktion) (Stock *et al.*, 2000; Surette *et al.*, 1996). In einem zweiten Schritt wird die Phosphatgruppe von der KD über direkte Wechselwirkung mit der RD auf das Aspartat des RR übertragen. Erst durch die hierdurch hervorgerufene Strukturveränderung des RR (z. B. Dimerisierung oder Oligomerisierung) kann dieser mit seiner OD, welche ein DNA-Bindemotiv (Helix-Turn(Kehre) -Helix-Motiv) oder eine enzymatische Aktivität aufweist als DNA-bindender Transkriptionsfaktor oder durch die Wechselwirkung mit RNA bzw. Proteinen die Genexpression bzw. Protein-Funktion regulieren (Stock und Da Re, 2000; Stock *et al.*, 1995). Die Inaktivierung des Systems resultiert aus der Dephosphorylierung des RR, hervorgerufen durch eine Phosphatase-Aktivität der HK, eine intrinsische Autophosphatase-Aktivität des RR (Parkinson, 1993; Stock *et al.*, 1995) oder zusätzliche Phosphatasen (Jung und Altendorf, 1998; Perego, 1998; Perego *et al.*, 1994). Ein rückläufiger Transfer des Phosphat-Restes vom RR auf die HK wurde ebenfalls beobachtet (Dutta und Inouye, 1996).

In *S. pneumoniae* konnten 13 HK/RR-Paare (TCS01 bis TCS13) und ein einzelner RR detektiert werden (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Bis auf ein Zwei-Komponenten-System sind alle nicht essentiell und entsprechen in ihrem Aufbau dem klassischen Typ. Alle RR besitzen eine DNA-bindende Domäne und wirken daher als transkriptionelle Regulatoren (Lange *et al.*, 1999). Zwei wichtige und bereits ausführlich untersuchte Zwei-Komponenten-Systeme sollen nun im Folgenden aufgrund ihrer Relevanz für diese Arbeit näher vorgestellt werden: das ComDE-System (TCS12), ein Regulator der Kompetenz und das CiaRH-System (TCS05), ein Regulator der Resistenz, Kompetenz und Virulenz in *S. pneumoniae*.

Die Fähigkeit zur genetischen Transformation, also den Austausch von genetischem Material, ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung und Verbreitung von β -Laktam-Resistenz in Pneumokokken. Voraussetzung hierfür ist „Kompetenz“, ein physiologischer Zustand, in welchem Bakterien in der Lage sind exogene DNA aufzunehmen (Dubnau, 1999; Lorenz und Wackernagel, 1994). Einige Bakterien, wie *S. pneumoniae*, in dem bakterielle Transformation zum ersten Mal beschrieben wurde (siehe 1.1.1) (Avery *et al.*, 1944; Griffith, 1928), sind natürlicherweise

kompetent (Johnsborg *et al.*, 2007). In *S. pneumoniae* ist die Kompetenz nicht über die gesamte Wachstumsphase ausgeprägt, sondern stellt einen streng regulierten Zelldichte-abhängigen Übergangszustand während des exponentiellen Wachstums dar (Dawson und Sia, 1931). Ihre Regulation erfolgt über einen Quorum-Sensing-Mechanismus, an dem fünf Proteine (Gene) beteiligt sind: das Peptid-Pheromon CSP (*comC*), der ATP-Binding-Cassette (ABC) -Transporter ComAB (*comAB*) und das Zwei-Komponenten-System ComDE mit der HK ComD (*comD*) und dem RR ComE (*comE*) (Abb. 1.6). Dabei wird das Gen *comC* in einem Operon mit *comD* und *comE* transkribiert. Induziert wird die Kompetenz durch das *comC*-Genprodukt CSP, ein 17 Aminosäure großes kationisches Peptid, welches als 41 Aminosäure großes Vorläuferpeptid mit einem N-terminalen Doppelglycin-Leader-Motiv ribosomal synthetisiert wird. Die Prozessierung und der Export dieses Peptids aus der Zelle in das Medium erfolgen durch den Transporter ComAB (Håvarstein *et al.*, 1995a; Håvarstein *et al.*, 1995b; Hui *et al.*, 1995; Pestova *et al.*, 1996). Eine basale Produktion von CSP liegt ständig vor. Überschreitet die extrazelluläre Konzentration dieses Proteins jedoch einen Schwellenwert, z. B. bei einer bestimmten Zelldichte, bindet CSP an die in der Cytoplasmamembran lokalisierte HK ComD, welche dadurch autophosphoryliert wird und den RR ComE transphosphoryliert. Daraufhin induziert dieser die Transkription der „frühen“ Kompetenzgene durch Bindung an eine imperfekte Repeat-Sequenz in der Promotorregion der Gene (Ween *et al.*, 1999). Unter den „frühen“ Kompetenzgenen befinden sich *comAB* und *comCDE* selbst, wodurch die Synthese und Freisetzung von CSP verstärkt und die Menge an phosphoryliertem ComE in der Zelle erhöht wird (autokatalytisches, -induzierendes System) (Claverys und Håvarstein, 2002). Darüber hinaus zählen hierzu das in den beiden Kopien *comX1* und *comX2* vorliegende Gen *comX*, welches für den alternativen Sigmafaktor ComX (σ^X) codiert (Lee und Morrison, 1999; Luo und Morrison, 2003), sowie das Gen *comW* für das ihn stabilisierende und aktivierende Protein ComW (Luo *et al.*, 2004; Sung und Morrison, 2005). ComX bindet an eine als Com- oder Cin- (Competence-induced) Box bezeichneten konservierten Sequenzabschnitt im Promotorbereich der „späten“ Kompetenzgene und aktiviert dadurch deren Transkription (Campbell *et al.*, 1998). Zu den späten Kompetenzgenen gehören Gene, welche für Proteine der DNA-Aufnahme- bzw. Prozessierungs- und Rekombinationsmaschinerie codieren, aber auch eine ganze Reihe bislang uncharakterisierter Gene. In Transkriptomstudien konnten etwa 124 Gene als CSP-induziert identifiziert werden, wobei jeweils 7 bis 8 % des gesamten Genoms vertreten war und die meisten dieser Gene für die eigentliche Transformation verzichtbar waren (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Claverys und Martin, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Håvarstein, 1998; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000). Diese Tatsachen verdeutlichen den globalen Einfluss der Kompetenz auf die Zelle und suggerieren, dass das Kompetenz-Regulon neben der Regulation der genetischen Transformation auch noch anderen Zwecken dient. Aus diesem Grund wurde es für sinnvoll gehalten anstatt des Begriffs „Kompetenz“ den neutralen Begriff „X-Zustand“ zu verwenden (Claverys *et al.*, 2006). Nur ein

Teil einer Kultur, welche sich im X-Zustand befindet, ist kompetent. Diese Zellen exprimieren und sekretieren vermehrt lytische Enzyme und Bakteriocine, bilden zugleich aber Immunitätsfaktoren, wodurch sie selber gegen die durch diese Proteine verursachte Lyse geschützt sind. Bei nicht-kompetenten Zellen, die keine solchen Immunitätsproteine produzieren, lösen die lytischen Enzyme hingegen die Lyse und damit Freisetzung von chromosomaler DNA aus, welche infolge von den kompetenten Zellen aufgenommen werden kann. Diese spezielle Form der Lyse, bei der eine Fraktion von kompetenten Zellen die Lyse einer Fraktion von nicht-kompetenten Zellen der gleichen Kultur bewirkt, wird „Allolyse“ oder „Pneumococcal fratricide“ („Brudermord“) genannt (Claverys und Håvarstein, 2007; Claverys *et al.*, 2007; Guiral *et al.*, 2005; Håvarstein *et al.*, 2006; Steinmoen *et al.*, 2003). Ein frühes Kompetenzgen (*comM*), fünf späte Kompetenzgene (*cbpD*, *lytA*, *cibABC*) und ein CSP-unabhängiges Gen (*lytC*) sind für diesen Prozess verantwortlich. Diese Gene codieren für die Immunitätsproteine ComM und CibC (*comM*, *cibC*), die Amidase/Peptidase CbpD (*cbpD*), das Pneumokokken-Hauptautolysin LytA (*lytA*) (siehe 1.2.1), das Zwei-Komponenten-Bakteriocin CibAB (*cibAB*) und das Lysozym LytC (*lytC*). Dabei initiieren die putativen Allolyse-Trigger-Faktoren CibAB und CbpD nach ihrer Sekretion ins Medium die LytA- und LytC-vermittelte Lyse der nicht-kompetenten Zellen. Gleichzeitig bieten die Immunitätsfaktoren CibC und ComM den kompetenten Zellen Schutz vor der bakterio- bzw. lytischen Aktivität von CibAB, CbpD, LytA und LytC (Eldholm *et al.*, 2009; Guiral *et al.*, 2005; Håvarstein *et al.*, 2006; Kausmally *et al.*, 2005; Moscoso und Claverys, 2004; Steinmoen *et al.*, 2002). Weshalb nur eine Fraktion von Zellen der gleichen Kultur Kompetenz entwickelt ist noch unklar. Die Ursache hierfür wird in dem von Chai *et al.*, 2008 beschriebenen Phänomen der „Bistabilität“, also der Aufspaltung einer genetisch identischen Kultur in Subpopulationen mit unterschiedlichem Genexpressionsmuster, vermutet (Chai *et al.*, 2008; Claverys *et al.*, 2007; Dubnau und Losick, 2006).

Die Entwicklung von Kompetenz in *S. pneumoniae* wird neben der Zelldichte von etlichen weiteren Faktoren beeinflusst (Claverys *et al.*, 2000). Eine Rolle spielen beispielsweise der pH-Wert (Chen und Morrison, 1987; Tomasz und Hotchkiss, 1964), die Konzentration zweiwertiger Ionen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) (Dintilhac *et al.*, 1997; Seto und Tomasz, 1976; Tomasz und Hotchkiss, 1964; Trombe *et al.*, 1992) von O_2 (Echenique *et al.*, 2000; Echenique und Trombe, 2001a; Hotchkiss, 1954; Lacks und Greenberg, 2001), PO_4^{3-} (Novak *et al.*, 1999) und Bovine Serum Albumine (BSA) (Hotchkiss, 1954; Hotchkiss und Ephrussi-Taylor, 1951), Oligopeptide bzw. deren Import-Proteine (AmiA/AliAB/AmiCDEF) (Alloing *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1996; Alloing *et al.*, 1998; Claverys *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 1994), die Präsenz einer Kapsel bzw. ihre Dicke (Ravin, 1959), Stress-Situationen, z. B. Antibiotika-Exposition (Prudhomme *et al.*, 2006), Proteine wie die Protease ClpP (Chastanet *et al.*, 2001), die Pyruvat-oxidase SpxB (Bättig und Mühlemann, 2008), die S-Ribosylhomocysteinase LuxS (Romao *et al.*, 2006), die Serin/Threonin-Kinase StkP (Echenique *et al.*, 2004) sowie Zwei-Komponenten-

Systeme wie das VicRK- (TCS02) (Echenique und Trombe, 2001b; Wagner, 2001) und das CiaRH-System (TCS05) (Guenzi *et al.*, 1994). Der molekulare Zusammenhang zwischen diesen Einflüssen und der Regulation der Kompetenz ist noch nicht geklärt, ebenso wie die Frage nach dem Mechanismus ihrer Abschaltung.

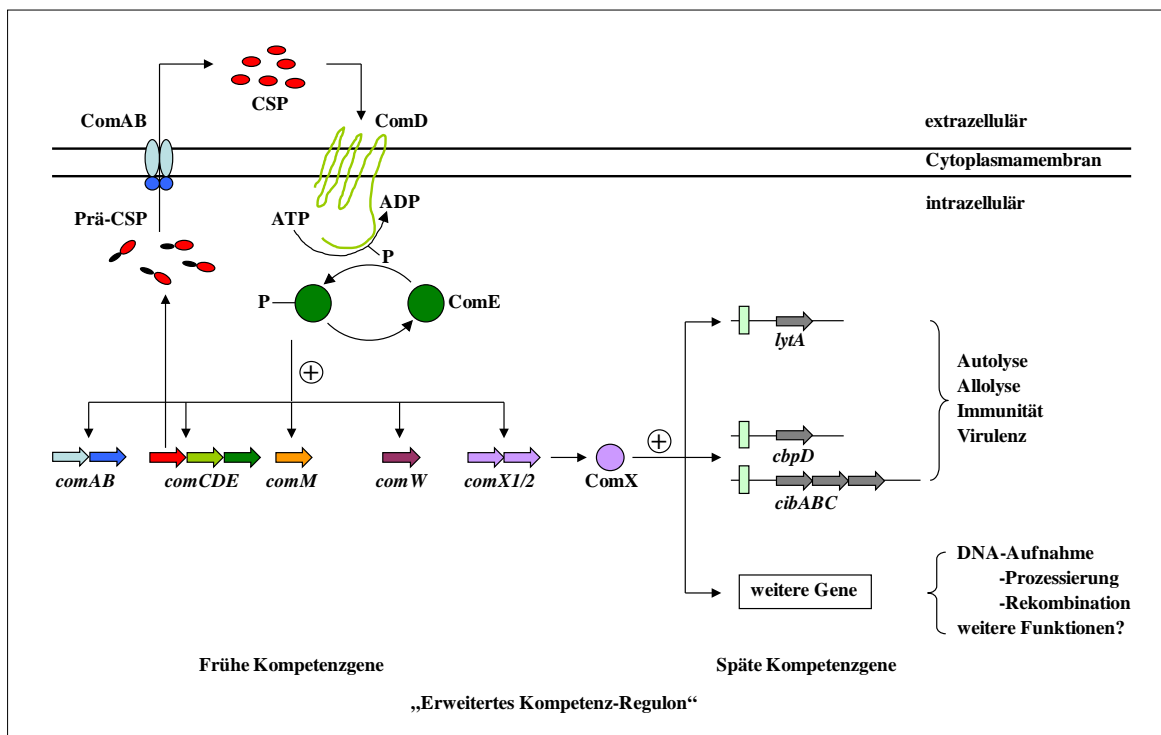


Abb. 1.6: Regulation der genetischen Kompetenz in *Streptococcus pneumoniae*.

Dargestellt ist der Signaltransduktionsweg zur Regulation der genetischen Kompetenz in *S. pneumoniae*. Das Pheromon CSP wird als Vorläuferpeptid ComC (Prä-CSP) synthetisiert, durch den ABC-Transporter ComAB prozessiert und in das Medium exportiert. Die extrazelluläre Konzentration von CSP wird durch die HK ComD, welche Teil des Zwei-Komponenten-Systems ComDE ist, perzipiert. Bei Überschreiten einer kritischen CSP-Konzentration wird ComD autophosphoryliert und überträgt im Gegenzug einen Phosphatrest auf den RR ComE. Dieser induziert daraufhin als DNA-bindender Transkriptionsfaktor die Expression der frühen Kompetenzgene, inklusive des in den beiden Kopien *comX1/2* vorliegenden Gens *comX*, welches für den alternativen Sigmafaktor ComX codiert. Dieser bindet an einen als Com- oder Cin-Box (hellgrünes Rechteck) bezeichneten konservierten Sequenzabschnitt im Promotorbereich der späten Kompetenzgene und aktiviert dadurch deren Transkription. Zu den späten Kompetenzgenen zählen Gene für Proteine der DNA-Aufnahme, -Rekombination bzw. -Prozessierung, Virulenzproteine sowie viele Proteine unbekannter Funktion. Kompetente Zellen sind über ihre Fähigkeit hinaus exogene DNA aufzunehmen und in das Genom zu integrieren in der Lage die Lyse von nichtkompetenten Zellen zu triggern (Allolyse). Transkriptomanalysen führten zu der Entdeckung einer ganzen Reihe zusätzlicher, CSP-abhängiger Gene, von denen die Mehrheit für die eigentliche Kompetenz und Transformation nicht gebraucht wird („Erweitertes Kompetenz-Regulon“). Ein + bedeutet eine positive Regulation, d. h. eine Verstärkung der Transkription.

Abk.: ADP (Adenosindiphosphat)

1.5 Das Zwei-Komponenten-System CiaRH: Regulatorische Schaltstelle zwischen Resistenz, Kompetenz und Virulenz in *Streptococcus pneumoniae*

... And things have come full ...

Im Zuge der Charakterisierung von Cefotaxim-resistenten Labormutanten (C-Mutanten) konnte CiaRH als erstes Zwei-Komponenten-System und erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* identifiziert werden (siehe 1.2.5) (Guenzi *et al.*, 1994). Das Zwei-Komponenten-System CiaRH stellt einen pleiotropen Regulator dar, welcher in die Cefotaxim-Resistenz, Kompetenz und Virulenz dieses Bakteriums involviert ist. Bereits die ersten Untersuchungen von Guenzi *et al.*, 1994 deuteten auf einen Zusammenhang zwischen CiaRH und zwei dieser Phänotypen hin und führten, wie in 1.2.5 schon erwähnt, zur Namensgebung dieses Systems (Cia: Competence induction and altered cefotaxime susceptibility). So fiel in der Nähe des konservierten His226-Restes der HK CiaH eine T230P-Punktmutation auf, welche alleine einen Anstieg der Cefotaxim-Resistenz und Verlust der Transformierbarkeit bewirkte. Es wird vermutet, dass diese Aminosäuresubstitution eine Inhibition der Phosphatase-Aktivität von CiaH und damit eine Aktivierung von CiaRH zur Folge hat (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Guenzi und Hakenbeck, 1995; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002). Auch in den anderen Labormutanten waren Veränderungen (Substitutionen, vorzeitige Termination) in CiaH zu verzeichnen, die alle Resistenz gegenüber Cefotaxim vermittelten. Darüber hinaus trat ab einer bestimmten Selektionsstufe eine Kompetenz-Defizienz auf, welche an das Vorhandensein einer CiaH-, in den meisten Fällen in Kombination mit einer PBP2x-Mutation, gekoppelt war und durch CSP-Zugabe komplementiert werden konnte (Guenzi *et al.*, 1994; Guenzi und Hakenbeck, 1995; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002). Eine ganze Reihe weiterer Untersuchungen bestätigten einen reprimierenden Einfluss von CiaRH auf die Kompetenz (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Merai, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005; Zähler *et al.*, 1996), eine direkte transkriptionelle Regulation konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass das Zwei-Komponenten-System vor der durch Zellwand-Inhibitoren (Bacitracin, Cycloserin, Penicillin, Piperacillin, Vancomycin), Detergentien (Desoxycholat (DOC), Triton) und Kompetenz hervorgerufenen Lyse schützt. Außerdem resultierte eine Inaktivierung von CiaRH in einer Beeinträchtigung des Wachstums und einer verstärkten und verfrühten Autolyse am Ende der stationären Phase, ein Effekt, der insbesondere in Kombination mit einzelnen PBP2x-Mutationen deutlich

wurde (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Giammarinaro *et al.*, 1999; Haas *et al.*, 2005; Heintz, 2006; Lange *et al.*, 1999; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2007).

Die Gene des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH werden als Operon transkribiert, wobei das Gen für die HK CiaH (*ciaH*) stromabwärts von dem Gen für den RR CiaR (*ciaR*) liegt und beide um 8 base pairs (bp) überlappen (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994). Der von CiaH perzipierte Stimulus konnte noch nicht ausgemacht werden; in Diskussion stehen Calcium- bzw. Phosphat-Ionen (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994). Da aber CiaRH auf ein breites Spektrum von Lyse-induzierenden Faktoren reagiert, spielt CiaH vermutlich eher eine allgemeine Rolle als Sensor für Zellhüllen-Stress, anstatt ein bestimmtes Signal zu detektieren (Hakenbeck *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 2008; Zähler *et al.*, 2002).

Aus mehreren Transkriptomstudien ging eine große Anzahl von CiaRH-abhängig exprimierten Genen hervor (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002). Zwischen den Studien bestanden jedoch zum Teil Unstimmigkeiten. Mittlerweile konnte das CiaR-Bindemotiv und mit dessen Hilfe und *in vitro*-Experimenten 16 CiaRH-regulierte Promotoren ermittelt werden, von denen 15 positiv und einer negativ reguliert werden (Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007). Insgesamt besteht das CiaRH-Regulon aus 30 Genen, wobei 19 Gene in sechs Operons organisiert sind. Dazu gehören *ciaRH* selbst, die Gene von fünf kleinen nicht-codierenden RNAs (*ccnA-E*), Gene, deren Produkte am Zellwand- (*lic1-*, *dlt*-Operon) und Zuckermetabolismus (*malM*, *malP*, *manL*, *manM*, *manN*) beteiligt sind, die Gene für die Stress-induzierte Serin-Protease HtrA (*htrA*), das Chromosomen-Segregationsprotein ParB (*parB*), die Peptidyl-Prolyl-Isomerase PpmA (*ppmA*), die Acetylerase Axe (*axeI*) sowie weitere Gene unbekannter Funktion. Dabei weist die Expression der Gene *ccnA-E*, *spr0931*, *htrA* und *parB* eine starke CiaRH-Abhängigkeit auf, weshalb diese als Kernregulon den weniger stark abhängigen Genen, dem erweiterten Regulon, gegenübergestellt werden. Unter allen Genen befindet sich bislang nur ein einziges, welches eindeutig mit den CiaRH-assoziierten Phänotypen in Verbindung gebracht werden konnte: das Gen *hrtA* für die Serinprotease HtrA. Für dieses Protein wurde ein Effekt auf die Virulenz und Kompetenz dokumentiert, wobei ersterer positiv und letzterer noch unklar ist (Hava und Camilli, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a, b; Schäfer, 2007; Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

PBP2x ist die wichtigste primäre Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* und seine Modifizierung stellt einen essentiellen Schritt in der Entwicklung der β -Laktam-Resistenz dieses Pathogens dar. Obwohl PBP2x zu den, im Bezug auf Entstehung und Verbreitung Resistenz-vermittelnder Mosaikstrukturen, am weitreichsten untersuchten PBP gehört, bleiben die Resistenzrelevanz

einzelner Punktmutationen sowie die mit der Veränderung dieses Proteins einhergehenden physiologischen und regulatorischen Auswirkungen auf die Zelle weitgehend unklar. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand demnach die Untersuchung von Punktmutationen im PBP2x von *S. pneumoniae*, im Hinblick auf ihren Einfluss auf die β -Laktam-Resistenz, die Funktionalität des Proteins und die Regulationsvorgänge in der Zelle. Von besonderem Interesse war dabei eine Punktmutation an Position Thr338, unmittelbar neben dem aktiven Serin von PBP2x, die immer wieder in resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten auftritt. Durch eine Mutationsanalyse von Thr338 sollte die Bedeutung dieser Punktmutation für die β -Laktam-Resistenz und Zellphysiologie im Kontext mit der sekundären Resistenzdeterminante PBP1a und den Zwei-Komponenten-Systemen CiaRH und ComDE aufgezeigt werden. Darüber hinaus sollte mit einer Transkriptomanalyse spontanresistenter Mutanten mit Punktmutationen im PBP2x und der HK CiaH des Regulationssystems CiaRH ein Einblick in die globalen zellulären Zusammenhänge der Resistenzentstehung gewonnen und mögliche kompensierende Mechanismen bzw. weitere an ihr beteiligte genetische Determinanten identifiziert werden.

Im Verlauf dieser Arbeit erschien eine Publikation, in der das Gen für das PBP2b von *S. gordonii*, einem nahen Verwandten von *S. pneumoniae* inaktiviert werden konnte (Haenni *et al.*, 2006). Diese Veröffentlichung gab den Anreiz dazu, eine frühere Arbeit von Kell *et al.*, 1993, in der eine Inaktivierung des Gens für das PBP2b von *S. pneumoniae* erfolglos blieb, zu überprüfen. Dabei erschien die von Kell und Mitarbeitern verfolgte Strategie zur Inaktivierung von *pbp2b* nicht überzeugend. Aus diesem Grund wurde mit zwei anderen Methoden erneut versucht *pbp2b* in *S. pneumoniae* zu inaktivieren bzw. deletieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

In den Tab. 2.1, Tab. 2.2 und Tab. 2.3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Dabei zeigt Tab. 2.1 die *S. pneumoniae*-Stämme, die als Ausgangsstämme für die konstruierten Derivate in Tab. 2.2 dienten und Tab. 2.3 die für Klonierungen eingesetzten *Escherichia (E.) coli*-Stämme.

Tab. 2.1: Ausgangsstämme von *Streptococcus pneumoniae*.

Bezeichnung	Genotyp	relevanter Phänotyp	Referenz
R6		R36A-Derivat, kapselfrei, hochkompetent, β -Laktame ^S	Avery <i>et al.</i> , 1944; Ottolenghi und Hotchkiss, 1962
amiA9	<i>rpsL</i> (K56T)	Str ^R , Ami ^R	Sicard, 1964; Salles, 1992
M31	<i>hex4</i> , <i>endl</i> , <i>exo2</i> , <i>trl</i> , RE2, Δ <i>lytA</i>	keine Autolyse	Sánchez-Puelles <i>et al.</i> , 1986
C301	<i>pbp2x</i> (T550A, L600W)	β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C401	<i>pbp2x</i> (T550A, L600W), <i>ciaH</i> (W9Stop)	β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C202	<i>ciaH</i> (Q236K, A413T)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C302	<i>pbp2x</i> (R512W), <i>ciaH</i> (Q236K, A413T)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C402	<i>pbp2x</i> (H394Y, R512W), <i>ciaH</i> (Q236K, A413T)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C103	<i>ciaH</i> (A203V)	β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C203	<i>pbp2x</i> (G597D), <i>ciaH</i> (A203V)	β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C303	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D), <i>ciaH</i> (A203V)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C403	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D), <i>ciaH</i> (A203V), <i>pbp2a</i> (V42Stop)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C503	<i>pbp2x</i> (R426C, T550A, G597D), <i>ciaH</i> (A203V), <i>pbp2a</i> (V42Stop)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C305	<i>pbp2x</i> (T526S), <i>ciaH</i> (N95D)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C405	<i>pbp2x</i> (L403F, T526S), <i>ciaH</i> (N95D)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987

Bezeichnung	Genotyp	relevanter Phänotyp	Referenz
C106	<i>pbp2x</i> (G601V)	β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C206	<i>pbp2x</i> (G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C306	<i>pbp2x</i> (G597D, G601V), <i>ciaH</i> (T230P)	nicht kompetent, β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C406	<i>pbp2x</i> (G597D, G601V), <i>ciaH</i> (T230P), <i>pbp2a</i> (S566Stop)	nicht kompetent, β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C506	<i>pbp2x</i> (M289T, G597D, G601V), <i>ciaH</i> (T230P), <i>pbp2a</i> (S566Stop)	nicht kompetent, β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
C606	<i>pbp2x</i> (M289T, G422D, G597D, G601V), <i>ciaH</i> (T230P), <i>pbp2a</i> (S566Stop)	nicht kompetent, β-Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
R6 _{<i>pbp2x</i>C206}	<i>pbp2x</i> (G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Krauβ, 1996
R6 _{<i>pbp2x</i>C303-20G*}	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D)	β-Laktame ^R	Mascher, 2001
R6 _{<i>pbp2x</i>C405-T1, -T6, -T7, -T8}	<i>pbp2x</i> (L403F, T526S)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C405-T5}	<i>pbp2x</i> (L403F)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C503-T1, -T3, -T4, -T5, -T6, -T7, -T8}	<i>pbp2x</i> (R426C, T550A, G597D)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C503-T2}	<i>pbp2x</i> (R426C, T550A)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C606-T3, -T4, -T6}	<i>pbp2x</i> (M289T, G422D, G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C606-T1}	<i>pbp2x</i> (M289T, G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C606-T5}	<i>pbp2x</i> (G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>pbp2x</i>C606-T7, -T8}	<i>pbp2x</i> (G422D, G597D, G601V)	β-Laktame ^R	Koch, 2006
R6 _{<i>ciaR::aphIII-rpsL</i>⁺}	<i>ciaR::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	Kan ^R	Schmitt, 2005
R6 _{<i>cpoA::aphIII-rpsL</i>⁺-1*}	<i>cpoA::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	Kan ^R	Volz, 2008
R6 _{<i>dexS::aphIII-rpsL</i>⁺-5*}	<i>dexS::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	Kan ^R	Becker, 2008
R6 _{<i>ciaR::aad9</i>}	<i>ciaR::aad9</i>	Spc ^R	Zähner, 1999
R6 _{<i>pbp2x</i>2349-2*}	<i>pbp2x</i> 2349(V241-K703)	β-Laktame ^R	Bergmann, 2003
R6 _{<i>pbp2x</i>2349<i>pbp1a</i>2349-2*}	<i>pbp2x</i> 2349(V241-K703), <i>pbp1a</i> 2349	β-Laktame ^R	Schähle, 2005
R6 _{<i>pbp2x</i>2349<i>ciaR::aad9</i>}	<i>pbp2x</i> 2349(V241-K703), <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R	Heintz, 2006

* Im Folgenden wurden die Klonbezeichnungen weggelassen und die Stämme als R6_{*pbp2x*C303}, R6_{*cpoA::aphIII-rpsL*⁺}, R6_{*dexS::aphIII-rpsL*⁺}, R6_{*pbp2x*2349} und R6_{*pbp2x*2349*pbp1a*2349} bezeichnet.

Abk.: Kan (Kanamycin), S (sensitiv), Spc (Spectinomycin), Str (Streptomycin), R (resistent)

Tab. 2.2: Konstruierte Derivate von *Streptococcus pneumoniae*.

Bezeichnung	Genotyp	relevanter Phänotyp
R6 _{pbp2xT338A}	<i>pbp2x</i> (T338A)	β-Laktame ^R
R6 _{pbp2xT338P}	<i>pbp2x</i> (T338P)	β-Laktame ^R
R6 _{pbp2xT338G}	<i>pbp2x</i> (T338G)	β-Laktame ^R
R6 _{pbp2xC203}	<i>pbp2x</i> (G597D)	β-Laktame ^R
R6 _{pbp2xC303}	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D)	β-Laktame ^R
R6 _{pbp2xT338ArpsLK56T}	<i>pbp2x</i> (T338A), <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Str ^R
R6 _{pbp2xT338PrpsLK56T}	<i>pbp2x</i> (T338P), <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Str ^R
R6 _{pbp2xT338GrpsLK56T}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Str ^R
R6 _{pbp2x2349rpsLK56T}	<i>pbp2x2349</i> (V241-K703), <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Str ^R
R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>pbp1a2349</i> , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Str ^R
R6 _{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL+}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>pbp1a::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Kan ^R
R6 _{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL+}	<i>pbp2x2349</i> (V241-K703), <i>pbp1a::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Kan ^R
R6 _{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>pbp1a::aphIII</i>	β-Laktame ^R , Kan ^R
R6 _{pbp2x2349pbp1a::aphIII}	<i>pbp2x2349</i> (V241-K703), <i>pbp1a::aphIII</i>	β-Laktame ^R , Kan ^R
R6 _{pbp2xT338AciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T338A), <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R
R6 _{pbp2xT338PciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T338P), <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R
R6 _{pbp2xT338GciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R
C303 _{ciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D), <i>ciaH</i> (A203V), <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R
R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>pbp1a2349</i> , <i>ciaR::aad9</i> , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Spc ^R , Str ^R
R6 _{pbp2x2349pbp1a2349ciaR::aad9}	<i>pbp2x2349</i> (V241-K703), <i>pbp1a2349</i> , <i>ciaR::aad9</i>	β-Laktame ^R , Spc ^R
R6 _{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL+ciaR::aad9}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>pbp1a::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>ciaR::aad9</i> , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Kan ^R , Spc ^R
R6 _{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL+ciaR::aad9}	<i>pbp2x2349</i> (V241-K703), <i>pbp1a::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>ciaR::aad9</i> , <i>rpsL</i> (K56T)	β-Laktame ^R , Kan ^R , Spc ^R
R6 _{comAB::aphIII}	<i>comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, Kan ^R
R6 _{pbp2xT338GcomAB::aphIII}	<i>pbp2x</i> (T338G), <i>comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, β-Laktame ^R , Kan ^R
C303 _{comAB::aphIII}	<i>pbp2x</i> (T550A, G597D), <i>ciaH</i> (A203V), <i>comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, β-Laktame ^R , Kan ^R

Bezeichnung	Genotyp	relevanter Phänotyp
R6 _{<i>ciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	<i>ciaR::aad9, comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, Spc ^R , Kan ^R
R6 _{<i>pbp2xT338GciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	<i>pbp2x(T338G), ciaR::aad9, comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, β-Laktame ^R , Spc ^R , Kan ^R
C303 _{<i>ciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	<i>pbp2x(T550A, G597D), ciaH(A203V), ciaR::aad9, comAB::aphIII</i>	nicht kompetent, β-Laktame ^R , Spc ^R , Kan ^R

Abk.: Kan (Kanamycin), Spc (Spectinomycin), Str (Streptomycin), R (resistent)

Tab. 2.3: *Escherichia coli*-Stämme.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZ, ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ(lac-proAB), F'[traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZΔM15]</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

2.2 Vektoren und Plasmide

In Tab. 2.4 sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Vektoren und Plasmide zusammengestellt. Die Plasmide standen zum Teil bereits zur Verfügung, zum Teil wurden sie im Verlauf dieser Arbeit hergestellt.

Tab. 2.4: Vektoren und Plasmide.

Bezeichnung	Merkmale	Selektion*	Referenz
pGEM [®] -T Easy (Promega)	<i>lacZα', bla</i>	Amp (100 µg/ml)	Promega
pBR322 (Roche)	<i>lacZα', bla, tet</i>	Amp (100 µg/ml), Tet (20 µg/ml)	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pGEM-1aRes	pGEM [®] -T Easy Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp1a2349 (238-2157)**</i>	Amp (100 µg/ml)	Chi, unveröffentlicht
pGEM-2xT338A	pGEM [®] -T Easy Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp2xT338A (258-2166)***</i>	Amp (100 µg/ml)	diese Arbeit
pGEM-2xT338P	pGEM [®] -T Easy Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp2xT338P (258-2166)***</i>	Amp (100 µg/ml)	diese Arbeit
pGEM-2xT338G	pGEM [®] -T Easy Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp2xT338G (258-2166)***</i>	Amp (100 µg/ml)	diese Arbeit

Bezeichnung	Merkmale	Selektion*	Referenz
pUC18 pbp2xC203 III/11	pUC18 Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp2xC203</i> (1469-2105) ^{***}	Amp (100 µg/ml)	Mascher, 2001
pUC18 pbp2xC303 II/11	pUC18 Derivat, kloniertes Fragment: <i>pbp2xC303</i> (1250-2093) ^{***}	Amp (100 µg/ml)	Mascher, 2001
pDG782	pMTL22 Derivat, <i>aphIII</i>	Amp (100 µg/ml), Kan (50 µg/ml)	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995

* Die angegebenen Selektionskonzentrationen beziehen sich auf *E. coli*.

** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008414 abgelegte *pbp1a*-Sequenz beginnend bei A₁TG.

*** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008411 abgelegte *pbp2x*-Sequenz beginnend bei A₁TG.

Abk.: Amp (Ampicillin), Kan (Kanamycin), Tet (Tetrazyklin)

2.3 Oligonukleotide

Den folgenden Tabellen (Tab. 2.5-Tab. 2.14) sind die verwendeten Oligonukleotide zu entnehmen. Diese wurden von den Firmen Operon, MWG Biotech und biomers.net synthetisiert. Oligonukleotid-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 100 µM in Tris-EDTA (TE) -Puffer hergestellt, Gebrauchslösungen durch 1:10- bzw. 1:100-Verdünnung der Stammlösungen in H₂O. Die Lagerung der Stamm- und Gebrauchslösungen erfolgte bei -20 °C.

Tab. 2.5: Oligonukleotide zur chromosomalen Modifikation von *Streptococcus pneumoniae*.

Bezeichnung	Position*	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
pbp2x_5'	258-292	35 →	GATTGCTGAGGATGCAACCTCTATAA TGTCTATG
pbp2x_3'	2166-2131	36 ←	GCCTTGAAATTCAAGTTCTATATTGAGC CACTTAGC
pbp2x_A-RM	997-1033	37 →	TATGAGCCAGGTTCC GGC ATGAAAGTG ATGATGTTGG
pbp2x_A-FM	1028-992	37 ←	ATCATCACTTTCAT GGC GGAACCTGGC TCATAGTTAC
pbp2x_P-RM	994-1029	36 →	AACTATGAGCCAGGTTCC CCT ATGAAA GTGATGATG
pbp2x_P-FM	1027-992	36 ←	TCATCACTTTCAT AGG GGAACCTGGCT CATAGTTAC
pbp2x_G-RM	996-1032	37 →	CTATGAGCCAGGTTCC GGC ATGAAAGT GATGATGTTG
pbp2x_G-FM	1029-992	38 ←	CATCATCACTTTCAT GGC GGAACCTGG CTCATAGTTAC

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
Ja-Kass_for	1073-1092	39 →	<u>TTAACCAAGCAGTAGAAACAG</u> GCCTA TTCCAGAGGAAATG
Ja-Kass_rev	1112-1093	41 ←	<u>GTTGATCCCCAGTCGCGGTT</u> CTAGG GCCCTTTTCCTTATGC
Ja-pbp1a_for	(-69)-(-41)	29 →	GGCTGGTGCCTTCCCTCAAATTCCTTAT C
Ja-pbp1a_rev	(+2382)-(+2354)	29 ←	CAAGTGTTAGCCTAGCCCTATCTGCTC TC
Ja-pbp1a-seq_for	1093-1116	44 →	<u>CATAAGGAAAGGGGCCCTAG</u> AACCG CGACTGGGGATCAACTATG
Ja-pbp1a-seq_rev	1092-1069	44 ←	<u>CCATTTCTCTGGAATAGGCT</u> GTTTC TACTGCTTGGTTAATTCC
1a-KanR_for	(-16)-4	41 →	<u>TAGGTGGTAAAACAAGATGA</u> GTAGA AAAGAGGAAGGAAATA
1a-KanR_rev	(+2177)-2158	39 ←	<u>AATCTGGATGATAAATGTTA</u> AAACAA TTCATCCAGTAAA
1a_for	(-937)-(-910)	28 →	TTTCATCTGATTGCCTTCATTCCAATTT
1a_rev	(+3088)-(+3063)	26 ←	ATGGTCTTGAAAGAAGCAACTGAAAT
1a-seq_for	2158-(+2181)	43 →	<u>TTTACTGGATGAATTGTTTT</u> TAACATTT ATCATCCAGATTTTTTC
1a-seq_rev	4-(-18)	42 ←	<u>ATTTCTTCTCTTTTCTACT</u> TCATCTT GTTTTACCACCTAAT
aphIII_for	544-563	42 →	<u>AACATTGTGGGTTCTTATTA</u> GCGAAC CATTTGAGGTGATAGG
aphIII_rev	551-532	42 ←	<u>GTTTGACTGATGAGGTTGCC</u> AAATTC CTCGTAGGCGCTCGGG
comAB_for	(-366)-(-337)	30 →	ATTATAGATCTTATGGGACTTTTTTTTCT AC
comAB_rev	(+3470)-(+3445)	26 ←	TTCTTGCCCGTAATCATCTGCAAGCG
comAB-seq_for	2698-2717	39 →	<u>GAGCGCTACGAGGAATTT</u> GGCAAC CTCATCAGTCAAAC
comAB-seq_rev	563-540	44 ←	<u>TATCACCTCAAATGGTTCGCT</u> AATAA GAACCCACAATGTTAATC
KanR_for		31 →	ttaa GGCGCGCC GCCTATTCCAGAGGAA ATG
KanR_rev		32 ←	ttaa GGCCGGCC TTTGGTGAATTCTAGG TACT
KanR_for-Pro	(-17)-3	39 →	<u>AAGATTTTAAGTTAG</u> AAATGGCTAAA ATGAGAATATCAC
KanR_rev-Pro	(+2075)-2055	42 ←	<u>AAAGCATAATTTCTTT</u> CTAAAACAA TTCATCCAGTAAAATA
pbp2b_P1	(-824)-(-795)	30 →	TGGGAACACTTGTAAGAGGTACAGTCT TTG

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
pbp2b_P4	(+2903)-(+2874)	30 ←	AAGGACAGAGACTTCGCGTTCGGCACT CCG
pbp2b_P2	112-93	32 ←	ttaa GGCGCGCC ACAACAAACGACCAAT AATG
pbp2b_P3	1950-1970	33 →	ttaa GGCCGGCC CGCTGTGCGCAGTGGTC TTCC
pbp2b_P2-Pro	3-(-19)	39 ←	<u>GATATTCTCATTTAGCC</u> ATTTCTAAC TTAAAATCTTAC
pbp2b_P3-Pro	2055-(+2079)	42 →	<u>TTACTGGATGAATTGTTT</u> TAGAAAGG AAATTATGCTTTATCC
amiA9 fwd1	(-2551)-(-2521)	31 →	GGCTCTAGGTCTTCAAAGATATCGACT TTGG
amiA9 rev1	(+2433)-(+2402)	32 ←	AAACAGTGTGCGATTTCTTGACGGCTGT TAGCG
rpsL_f	(-102)-(-73)	30 →	AGTGTACAGGGACGTGCTGACAAATGT TGC
rpsL_r	(+490)-(+461)	30 ←	ATTGTATAGCGGATCTGGCAATACGTC ACG
rpsEdown_r	(-960)-(-928)	33 →	CTGCTGGTGTGAAATCACTAACAATG ACAACG
rpsEup_f	(+1076)-(+1045)	32 ←	GGTCAAGGTTCAACAATTGCGTATTCTTT AGCG

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter den Genbanknummern AE008411, AE008414, AE008388, AE008520, AE008406 und AE008402 abgelegten *pbp2x*-, *pbp1a*-, *comAB*-, *pbp2b*-, *rpsL*- und *rpsE*-Sequenzen beginnend bei A₁TG. Von diesen Sequenzen abweichende Basen sind fett hervorgehoben. Rot: veränderte Basen zur Mutagenese, grün: *AscI*- und *FseI*-Restriktionsschnittstellen, unterstrichen: Linkersequenzen zur überlappenden Polymerase Chain Reaction (PCR) (siehe 2.7.2.4). Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - bzw. + in den Positionsangaben die Abstände von dem Startcodon in 5'- bzw. 3'-Richtung an.

Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Überprüfung der chromosomalen Modifikation von *Streptococcus pneumoniae*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
KO-1a_for	(-1321)-(-1292)	30 →	GCCACGGACTTCACGTCCAAACTCTTGT TC
KO-1a_rev	(+3403)-(+3372)	32 ←	CTGAAGAATACTTGCCAACGGTTGCCA TGAC
KO-comAB_for	(-2185)-(-2152)	34 →	GGCCTATGCAGCGACATGTTGGTGGTA ATTATGG
KO-comAB_for_IS	(-933)-(-906)	28 →	TGCGCAATGAAGCTCATCTCCATCTCCC
KO-comAB_rev	(+3795)-(+3766)	30 ←	ACACCGTTGAAAGCAGTCGCCTGGTCC TTG

Bezeichnung	Position*	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
KO-comAB-seq_for	1341-1370	30 →	GCTTCAGACAGCGCAGGTTGCCAATAA CCG
KO-comAB-seq_rev	1034-1001	34 ←	GAAGACAGAACCGCATTGGCTTCCATG GTATCCC
pbp2b_for	156-174	19 →	CTCAGCTAGTCAGACCAAG
pbp2b_for_1	476-447	30 ←	TTATACAGTTCTGATTCCGGATAGACGAT TG
pbp2b-Seq_rev	1649-1631	19 ←	CGAGGAGCCACACGAACAC
pbp2b-up_for	33-52	20 →	CCATTCGATTCCGATTCCGGC
pbp2b-dn_rev	2031-2011	21 ←	CAGATTGATAATGTCACGCGC
recR-528_rev	(+2596)-(+2579)	18 ←	CACAGCGAGACCTCGTGC
KO_P1	(-1202)-(-1168)	35 →	ACCTAAGATCCGCACAGCCTTGAAAGA GGCTTTGG
KO_P4	(+3117)-(+3083)	35 ←	GAAGGACTGGAAAGACCACTGCACCTT CTTCGTAG
KO-2b_P2	775-743	33 ←	TAAGATAGGCTTCTGCTTCTTCCGCTGG GAGAC
KO-2b_P3	1860-1892	33 →	AACAGGTACAGCCGAAAGCTATGTGGC AGATGG
KO-Kan_P2		34 ←	CCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAG CCATAG
KO-Kan_P3		32 →	ACGGCGACCTGGGAGACAGCAACATCT TTGTG
KO_P11	(-823)-(-795)	29 →	GGGAACACTTGTAAGAGTACAGTCTTT G
KO_P111	(-1064)-(-1037)	28 →	TGGCTCAGCCAACTAGGATTTTCTTAC
KO_P44	(+2298)-(+2271)	28 ←	CGAGTCGGATCAGTACAGATAGAACAA G
KO-Kan_P22		28 →	AGAAAATGAAAACCTATATTTAAAAATG
KO-Kan_P222		30 →	CGCGCCGCCTATTCCAGAGGAAATGGA TCG
KO-Kan_P33_for		29 →	GGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGATCTTG G
KO-Kan_P33_rev	2030-2003	28 ←	AGATTGATAATGTCACGCGCAATGGAAG
KO-Kan_P333_for		27 →	GACTTACTGGGGATCAAGCCTGATTGG

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter den Genbanknummern AE008414, AE008388 und AE008520 abgelegten *pbp1a*-, *comAB*- und *pbp2b*-Sequenzen beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - bzw. + in den Positionsangaben die Abstände von dem Startcodon in 5'- bzw. 3'-Richtung an.

Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp2x*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
1761	623-603	21 ←	TCTTCATTTTCATGGAGCTGA
PM39	1727-1699	29 ←	CTCATCGATACAGCCGAGAAAATATAGTC
pn2xdown	(+2285)-(+2251)	35 ←	GGCGAATTCCAGCACTGATGGAAATAAACA TATTA
2x1453for	315-340	26 →	GTCAGCAACGGGTAAGCTTCTTTACG
pbp2x-R6seq_rev	1842-1821	22 ←	CATAGCTGAAGCCCGCTCCAAG
pbp2x_J_F	(-438)-(-419)	20 →	GGAATTGGTGTCCCGTAAGC
pbp2x_J_R	(+2362)-(+2342)	21 ←	CATCTGCTGGCCTGTAATTTG
2x-seq_for	1290-1313	24 →	GGATGAGTATGCTGGTCAGCTTCC
2x-seq_for_1	1862-1882	21 →	AAACAACAGCTAAGGCTTTGG
600-R6-for	714-739	26 →	GGATCGTCTGGGTAATATTGTACCCG
600-R6-rev	1313-1290	24 ←	GGAAGCTGACCAGCATACTCATCC
480-R6-for	776-802	27 →	AGGATGTTTATAACAACCATTTCAGCC
480-R6-rev	1254-1228	27 ←	ACGATTAAGATAATCAAGCCAGGTAGC
360-R6-for	847-875	29 →	AAGGTAAAAGGAAAGTACATGACAGCGAC
360-R6-rev	1206-1182	25 ←	GAGGGTCATCCCAACGTTACTTGAG
120-R6-for	958-982	25 →	GAGGACTTTGTTTGGCGTGATATCC

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008411 abgelegte *pbp2x*-Sequenz beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - bzw. + in den Positionsangaben die Abstände von dem Startcodon in 5'- bzw. 3'-Richtung an.

Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp2a*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
2a-1U	(-169)-(-144)	26 →	CTAGGGATGAGGAGTTGTTCCCTCAAG
2a-3U	428-461	34 →	ATGGCCGTTTCTTCTTGGCTATTGTCACTGCTGG
2a-5U	1134-1156	23 →	GGGAGTTCGTGGAGTTGTCGGTC
2a-6U	1659-1686	28 →	ACGGGTGATTGATAAGTCTGTAGCTGAC
2a2268R	(+2300)-(+2268)	33 ←	AGTTTCTCGAACCACAAACCGCACAAAGCTAGGC

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008546 abgelegte *pbp2a*-Sequenz beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - bzw. + in den Positionsangaben die Abstände von dem Startcodon in 5'- bzw. 3'-Richtung an.

Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp1a*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
pbp1a_for	238-257	20 →	CCCACAGATTTGGTTAAGGC
pbp1a_rev	2157-2136	22 ←	TGGTTGTGCTGGTTGAGGATTC
pbp1a-Seq_for	718-738	21 →	GGTTACATCTCTGCTGAACAG
pbp1a-Seq_rev	1744-1724	21 ←	CATCTGGAGCTACATAGCCAG
mut1a-for	(-473)-(-446)	28 →	TATTTGTCTCAGGGCTTGGCTGTTATAC
mut1a_rev	(+2615)-(+2588)	28 ←	TCTCTTGACGGAAAGAATGGTGGAATAC
pbp1a_J_F	(-804)-(-785)	20 →	GTAAACACAAGCCAAGACAC
pbp1a_J_R	(+2425)-(+2407)	19 ←	CCAGCAACAGGTGAGAGTC

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008414 abgelegte *pbp1a*-Sequenz beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - bzw. + in den Positionsangaben die Abstände von dem Startcodon in 5'- bzw. 3'-Richtung an.

Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaRH*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
ciaH_for	562-591	30 →	TCGGTTGTCGAAGTCTATGTTTCAAAAAGTC
ciaH_rev	2073-2049	25 ←	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
ciaH-seq_for	1209-1237	29 →	AATTGATTGTGGTCGTGATGGCTAGTTTC
CiaR_for	(-459)-(-432)	28 →	TTGGCAGCAGCTCTTGCATACAGTACAG
CiaR_rev	632-604	29 ←	ACCGAAATCGTTGTATCACTATCAAATCC
CiaR-seq_for	80-100	32 →	TATTGGTTGAGGATGACCTAGCATCGATTTTC
CiaR-seq_rev	101-96	30 ←	GACCTAGCCCAATTAGAATGAATATTTCCC
ciaR up for	(-804)-(-775)	30 →	ATTGATGAAGGAACGGATGCTGAAACAGCC
CiaR721rev	723-697	27 ←	AAGATACCCAACACTACGCAAGGTTTG

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008447 abgelegte *ciaRH*-Sequenz beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - in den Positionsangaben den Abstand von dem Startcodon in 5'-Richtung an.

Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *cpoA*.

Bezeichnung	Position *	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
cpoAseq1	(-508)-(-489)	20 →	GCGCACACTTGAAGATGTGG
cpoAseq2	(-23)-(-4)	20 →	AGCATGTGAGAGACTGTTGG
cpoAseq3	640-659	20 →	CTTTATCCGTCTGGCTGAGG

Bezeichnung	Position*	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
cpoAseq5	1716-1697	20 ←	TCCTGCTTGATTCCGGACG
cpoAseq6	1125-1106	20 ←	TACTTTCTCCCTAAAGCGGC
cpoAseq7	323-303	21 ←	GCACATAGCCAATCTTTCTCC

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer Y11463 abgelegte *cpoA*-Sequenz beginnend bei A₁TG. Bei außerhalb des entsprechenden Gens lokalisierten Oligonukleotiden gibt ein - in den Positionsangaben den Abstand von dem Startcodon in 5'-Richtung an.

Tab. 2.12: Oligonukleotide zur Amplifikation von *aroE*.

Bezeichnung	Position*	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
aroE-up	85-101	17 →	GCCTTTGAGGCGACAGC
aroE-dn	563-540	23 ←	TGCAGTTCA(G/A)AAACAT(A/T)TTCTAA

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008495 abgelegte *aroE*-Sequenz beginnend bei A₁TG.

Tab. 2.13: Oligonukleotide zur Durchführung der 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE).

Bezeichnung	Position*	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
5'RACE		39 →	GAU AUGCGCGAAUCCUGUAGAACGAACACUAGA AGAAA
RACE-PCR_5'		18 →	GATATGCGCGAATTCCTG
pbp2b_race_1	335-309	27 ←	CTGATGCTCACATAAGTCAGTAACTTT
pbp2b_race_2	267-240	28 ←	ACGCGTAAAGGAAACAACCTGCTTTAAC

* Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer AE008520 abgelegte *pbp2b*-Sequenz beginnend bei A₁TG.

Tab. 2.14: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung klonierter Fragmente.

Die beiden Oligonukleotide flankieren die MCS (Multiple Cloning Site) von Vektoren und dienen der Amplifikation und Sequenzierung klonierter Fragmente.

Bezeichnung	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5' → 3')
pUK/M13-for24	24 →	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
pUK/M13-rev22	22 ←	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

2.4 Nährmedien

2.4.1 C-Medium (CpH8)

Streptokokken benötigen für ihr Wachstum ein komplexes Nährmedium, das neben einer Kohlenstoffquelle auch Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine, Cholin und Vitamine enthält. Zur Kultivierung von *S. pneumoniae* wurde in dieser Arbeit – soweit nicht anders spezifiziert – das semisynthetische Komplexmedium CpH8 (nach Lacks und Hotchkiss, 1969) verwendet. Die einzelnen Medienkomponenten wurden separat hergestellt und unmittelbar vor Gebrauch des Mediums steril zusammenpipettiert. Bei Bedarf wurden entsprechende Nährmedienzusätze (siehe Tab. 2.22) zugegeben. Die Zusammensetzung des C-Mediums, sowie der Komponenten und ihrer Zusätze ist in den Tab. 2.15, Tab. 2.16 und Tab. 2.17 beschrieben. Das Medium und die Komponenten wurden bei 4 °C gelagert.

Tab. 2.15: Zusammensetzung des C-Mediums.

Komponente	Menge
PreC	400 ml
Supplement	13 ml
Glutamin (1 mg/ml)	10 ml
Adams III	10 ml
Pyruvat (2 %)	5 ml
Phosphatpuffer pH 8	15 ml
Hefeextrakt (5 %)	9 ml

Abk.: pH (pondus Hydrogenii)

Tab. 2.16: Zusammensetzung der Komponenten des C-Mediums.

Komponente	Menge
PreC	
Na-Acetat, wasserfrei	1,21 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren	

Komponente	Menge
Supplement	
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
Komponenten einzeln autoklavieren und steril zusammenpipettieren	
Adams III	
Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
CaCl ₂ (0,1 M)	1,6 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
sterilfiltrieren und dunkel lagern	
Phosphatpuffer pH 8	
KH ₂ PO ₄ (1 M)	53 ml
K ₂ HPO ₄ (1 M)	947 ml
autoklavieren	

Tab. 2.17: Zusammensetzung der Zusätze der Komponenten des C-Mediums.

Komponente	Menge
3 in 1 Salts	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
MnSO ₄ (0,1 M) x 4 H ₂ O	0,2 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
autoklavieren	
Adams I	
Biotin	0,15 mg

Komponente	Menge
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
sterilfiltrieren und dunkel lagern	

Adams II

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl konz.	10 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
sterilfiltrieren und dunkel lagern	

Abk.: konz. (konzentriert)

2.4.2 M17-Medium

Zur Kultivierung von *S. pneumoniae* wurde alternativ zum C-Medium auch M17-Medium verwendet (Terzaghi und Sandine, 1975). M17-Medium ist ein zur Anzucht von Laktokokken eingesetztes synthetisches Komplexmedium, das sich durch eine hohe Pufferkapazität auszeichnet. Das Medium wurde gebrauchsfertig bezogen, nach Herstellerangaben angesetzt und Glukose als Substrat für die Fermentation hinzugefügt. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Tab. 2.18 aufgezeigt.

Tab. 2.18: Zusammensetzung des M17-Mediums.

Komponente	Menge
Casein-Aufschluss	5 g
Sojapepton	5 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Ascorbinsäure	0,5 g

Komponente	Menge
MgSO ₄	0,25 g
β-Natriumglycerophosphat	19 g
H ₂ O	ad 1000 ml
für 15 min autoklavieren, vor Gebrauch autoklavierte Glukose steril zugeben (Endkonzentration: 0,5 % (v/v))	
Abk.: v/v (volume/volume)	

2.4.3 Todd Hewitt-Broth (THB-Medium)

Ein weiteres, alternativ zu C-Medium eingesetztes Medium zur Anzucht von *S. pneumoniae* war das THB-Medium (nach Todd und Hewitt, 1932), welches in erster Linie seine Anwendung in der Kultivierung von β-hämolytischen Streptokokken findet. Das Medium wurde gebrauchsfertig bezogen und nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die einzelnen Komponenten dieses Mediums sind Tab. 2.19 zu entnehmen.

Tab. 2.19: Zusammensetzung des THB-Mediums.

Komponente	Menge
Rinderherz, Infusion von	3,1 g
Pepton	20 g
Dextrose	2 g
NaCl	2 g
Na ₃ PO ₄	0,4 g
Na ₂ CO ₃	2,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
für 15 min autoklavieren	

2.4.4 D-Blutagar

Als Festmedium für *S. pneumoniae* diente D-Agar mit Zusatz von defibriniertem Schafsblut (Oxid). Auf diesem Nährboden ist *S. pneumoniae* aufgrund seines α-hämolytischen Verhaltens sehr gut nachweisbar. Der Agar wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C abgekühlt und mit 3 % (v/v) Blut versetzt. Bei Bedarf wurden zusätzlich entsprechende Antibiotika (siehe Tab. 2.22) zur Selektion zugegeben. In Tab. 2.20 sind die Komponenten des D-Agars aufgelistet.

Tab. 2.20: Zusammensetzung des D-Agars.

Komponente	Menge
Glukose	1 g
Bactopecton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	17 g
H ₂ O	ad 1000 ml
autoklavieren, vor Gebrauch auf ca. 50 °C abkühlen lassen und defibriertes Schafsblut steril zugeben (Endkonzentration: 3 % (v/v))	

2.4.5 Lysogeny-Broth (LB-Medium)

Das Standardmedium für die Anzucht von *E. coli* war LB-Medium (Bertani, 1951), dessen Zusammensetzung in Tab. 2.21 aufgeführt ist. Bei Verwendung als Festmedium wurden noch 1,5 % Agar hinzugefügt. Wenn erforderlich, erfolgte die Zugabe von entsprechenden Antibiotika bzw. sonstigen Nährmittelzusätzen (siehe Tab. 2.22).

Tab. 2.21: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Komponente	Menge
Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
autoklavieren	

2.5 Nährmedienzusätze

Bei Bedarf wurden den Fest- und Flüssigmedien Antibiotika oder sonstige Substanzen zugegeben, die in Tab. 2.22 zusammengefasst sind. Die Stammlösungen dieser Nährmedienzusätze wurden nach ihrer Herstellung sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch eventuell noch verdünnt.

Tab. 2.22: Nährmedienzusätze.

Nährmedienzusatz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	10 mg/ml, 200 mg/ml	100 µg/ml
Cefotaxim	H ₂ O	10 mg/ml	variabel
Kanamycin	H ₂ O	100 mg/ml, 200 mg/ml	40-200 µg/ml
Oxacillin	H ₂ O	10 mg/ml	variabel
Penicillin G	H ₂ O	10 mg/ml	variabel
Piperacillin	H ₂ O	10 mg/ml	variabel
Spectinomycin	H ₂ O	20 mg/ml, 100 mg/ml	20 µg/ml, 100 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O	200 mg/ml	200 µg/ml
BSA	H ₂ O	8 %	0,06-0,072 % (v/v)
Cholinchlorid			2 %
CSP	H ₂ O	10 µg/ml	100 ng/ml
IPTG	H ₂ O	0,1 M	0,5 mM
X-Gal	N,N'-dimethylformamid	50 mg/ml	80 µg/ml

Abk.: IPTG (Isopropylthiogalaktosid), X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid)

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Konservierung von Stämmen

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 100 oder 200 µl-Aliquots steriles Glycerin in Cryoröhrchen (Nunc) vorgelegt und mit jeweils 0,5 oder 1 ml einer exponentiell wachsenden *S. pneumoniae*-Kultur versetzt (Endkonzentration: ca. 15 % (v/v)). Diese Mischung wurde gevortext, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde eine höhere Glycerinkonzentration eingesetzt (Endkonzentration: ca. 20 % (v/v)). Die Glycerinkulturen wurden zur Überprüfung ihrer Reinheit routinemäßig auf Festmedien ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

2.6.2 Anzuchtbedingungen

Zur Anzucht von *S. pneumoniae* in Flüssigmedium wurden Vorkulturen angelegt. Dazu wurden die Stämme aus Glycerinkultur oder von Blutagarplatte in 6 ml bzw. 2 ml (bei Einzelkolonien) Medium angeimpft und bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte eine 1:20-Verdünnung der Kulturen in frischem vorgewärmtem Medium und eine weitere Kultivierung für nachfolgende Experimente. Dabei wurden

die *S. pneumoniae*-Stämme bereits am Vorabend als Vorkultur angeimpft, mußten aber aufgrund ihres Autolyseverhaltens nach Erreichen der stationären Phase zunächst in einem Eiswasserbad inkubiert werden. Mithilfe einer Zeitschaltuhr konnte dann der Beginn der Inkubation bei 37 °C so gesteuert werden, dass sich die Kulturen am nächsten Morgen noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Zum Wachstum auf Festmedium wurden die Bakterienstämme mit einem sterilen Glasstab, Zahnstocher (bei *E. coli*) bzw. einer Impföse aus Flüssig-, Glycerinkultur oder von einer bereits bebrüteten Platte auf Agarplatten ausgestrichen. Alternativ wurden 100 µl einer Flüssigkultur mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigmedium wurden 2-5 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer frisch ausgestrichenen Agarplatte inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

2.6.3 Messung des Wachstums

Das Wachstum von *S. pneumoniae* wurde über die Messung der Lichtstreuung (Nephelo) einer Flüssigkultur mithilfe eines Nephelometers (Nephelometer Head) (Diffusion Systems LTD) verfolgt. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden 10 ml frisches, vorgewärmtes Flüssigmedium mit einer Vorkultur 1:20 beimpft und die Messwerte mindestens alle 30 min dokumentiert. Alternativ erfolgte die Wachstumsmessung wie bei *E. coli* über die Messung der Lichtabsorption, also durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer, entweder in einer Küvette (Ultraspec[®] III) (Pharmacia LKB Biotechnology) oder in einem Reagenzglas (Novaspec[®] II) (Pharmacia LKB Biotechnology).

Durch halblogarithmische Auftragung der Messwerte und das Anlegen einer Regressionsgeraden im linearen Bereich der Wachstumskurve (exponentielle Wachstumsphase) konnten die Anfangs- und Endzellzahl in einem bestimmten Zeitraum abgelesen werden und die Wachstumsrate μ bzw. Generationszeit g nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$\mu [\text{min}^{-1}] = (\ln X - \ln X_0) / (t - t_0)$$

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

mit

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t (Endzellzahl)

X_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 (Anfangszellzahl)

t, t_0 = entsprechende Zeitpunkte [min].

2.6.4 Mikroskopie

Zur Untersuchung der Morphologie und Vitalität von *S. pneumoniae*-Zellen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene mikroskopische Untersuchungsmethoden angewandt: die Phasenkontrast-

und die Fluoreszenzmikroskopie. Präparate für die Mikroskopie wurden ausschließlich aus wachsenden Flüssigkulturen hergestellt, wobei dem Nährmedium bei Bedarf Cholinchlorid (Endkonzentration: 2 %) zugesetzt wurde. In dieser Konzentration verhindert die Substanz durch Inhibition des Zellwandenzym N-Acetylglucosaminidase LytB die Tochterzelltrennung bei der Zellteilung, wodurch es zur Kettenbildung kommt und morphologische Aberrationen besser sichtbar werden (Briese und Hakenbeck, 1983).

2.6.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Um morphologische Veränderungen bzw. Verunreinigungen eines *S. pneumoniae*-Stammes festzustellen, wurde eine mikroskopische Analyse einer exponentiell wachsenden Kultur durchgeführt. Hierzu wurden ca. 5 µl Bakteriensuspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt, welches vorsichtig angedrückt wurde. Die Zellen wurden zunächst mit dem 40fachen Objektiv im Phasenkontrastmikroskop (Eclipse E600) (Nikon) fokussiert und anschließend unter Verwendung eines 100fachen Ölimmersionsobjektivs und einer Kameraeinrichtung (CDD-1300B) (Nikon) untersucht bzw. fotografiert.

2.6.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Vitalität von *S. pneumoniae*-Zellen wurde der LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit L13152 (Invitrogen) verwendet. Dieser Kit beruht auf einer Fluoreszenzfärbemethode, die die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen in einer Kultur erlaubt. Dabei finden zwei verschiedene, sich spezifisch an Nukleinsäure anlagernde Fluoreszenzfarbstoffe Verwendung: der grün-fluoreszierende Farbstoff SYTO9 und der rot-fluoreszierende Farbstoff Propidiumjodid (PI). Während SYTO9 in der Lage ist die intakte Cytoplasmamembran zu passieren, also sowohl in lebende als auch in tote Zellen eindringt (die Zellen fluoreszieren grün), gelangt PI nur in Zellen, deren Membran geschädigt ist und die demnach tot sind. In Anwesenheit beider Fluoreszenzfarbstoffe kommt es in den toten Zellen zu einer Überlagerung der Grünfluoreszenz durch PI, welche dann folglich rot fluoreszieren.

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Kulturen unter Zusatz von Cholinchlorid (Endkonzentration: 2 %) zum C-Medium angezogen. In der früh-, mid- und spätexponentiellen Wachstumsphase wurden jeweils 1 ml Kultur entnommen und für 2 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (Upm) abzentrifugiert (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf). Zum Entfernen von Medienrückständen, die zu einer ungewollten Hintergrundfluoreszenz führen konnten, wurde das Zellpellet in 200 µl H₂O gewaschen und schließlich in (0,5 x Nephelo der Zellen bei der Entnahme) µl H₂O resuspendiert. Gleiche Volumina dieser Bakteriensuspension und der Farbstoffstocklösung wurden gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. 7 µl dieses Ansatzes wurden auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und für weitere 10 min die Inkubation fortgesetzt. Dabei fand eine gleichzeitige Färbung und Anheftung der Zellen statt,

wobei für die Immobilisierung eine Vorbehandlung der Objektträger notwendig war. Diese wurden vor Verwendung mit H₂O, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (0,1 %), H₂O und EtOH (70 %, technisch (tech.)) gewaschen und zum Entfetten mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Anschließend wurden 25 µl Poly-L-Lysin-Hydrobromid-Lösung (0,1 mg/ml) auf die Mitte der Objektträger aufgebracht und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abspülen mit H₂O und Trocknen der Objektträger konnten diese problemlos für einige Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden. Nach Färbung und Immobilisierung der Zellen auf dem Objektträger wurden diese zunächst unter Verwendung eines 100fachen Ölimmersionsobjektivs im Phasenkontrastmikroskop (Eclipse E600) (Nikon) fokussiert und anschließend im Fluoreszenzstrahlengang betrachtet. Dabei wurden zwei verschiedene Filtersätze verwendet: Filter B-2A (green longpass: EX 450-490, DM 505, BA 520) (Nikon), welcher die gleichzeitige Betrachtung beider Fluoreszenzen ermöglicht und Filter G-2A (red longpass: EX 510-560, DM 575, BA 590) (Nikon), welcher die alleinige Betrachtung der roten Fluoreszenz erlaubt. Für die Dokumentation wurden die Zellen mithilfe einer Kameraeinrichtung (CDD-1300B) (Nikon) fotografiert, wobei zügig gearbeitet wurde, da bereits wenige Minuten nach Beginn der Lichtexposition ein deutliches Ausbleichen der Fluoreszenz zu beobachten war. Die zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Lösungen sind in Tab. 2.23 aufgeführt.

Tab. 2.23: Lösungen zur Fluoreszenzmikroskopie.

Komponente	Menge/Konzentration
SYTO9/PI (2x)	
SYTO9	12 µM
PI	60 µM
Inhalt der beiden Plastikpipetten in 5 ml H ₂ O lösen, bei -20 °C dunkel lagern	
SDS	0,1 %
EtOH tech.	70 %
Poly-L-Lysin-Hydrobromid-Lösung	0,1 mg/ml

2.6.5 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK ist definiert als die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der gerade kein Mikroorganismenwachstum mehr sichtbar ist. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der MHK mithilfe der Plattenverdünnungsmethode. Diese Testmethode ermöglicht im

Gegensatz zu anderen Verfahren wie Disk-Diffusionstest oder E-Test eine feinere Abstufung der Antibiotikakonzentrationen, wie sie gerade bei den hier untersuchten *S. pneumoniae*-Stämmen erforderlich war.

Zur Durchführung des Plattenverdünnungstests wurde eine Serie von frischen Blutagarplatten mit steigenden Konzentrationen der β -Laktame Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin oder Oxacillin gegossen, wobei die Abstufung der Konzentrationen in 0,01er, 0,05er und 0,1er Schritte [$\mu\text{g/ml}$] erfolgte. Da es sich hierbei um vergleichsweise geringe Konzentrationsunterschiede handelte, wurde auf gleiche Testbedingungen geachtet, um Schwankungen von Ergebnissen möglichst gering zu halten. Die zu testenden Stämme wurden in C-Medium bis zu einer Nephelo von 30 angezogen und mit sterilen Glasstäben auf den Blutagarplatten ausgestrichen. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 30 bzw. 37 °C abgelesen. Das Wachstum von nur wenigen Einzelkolonien wurde als Inhibition angesehen.

2.6.6 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um ein natürlich kompetentes Bakterium, welches über den größten Teil der exponentiellen Wachstumsphase DNA aufnehmen und transformiert werden kann. Dabei wird die Kompetenz in *S. pneumoniae* streng reguliert und erreicht ihr Maximum normalerweise in der midexponentiellen Phase. Da die Lage dieses Kompetenzpeaks aber variieren kann und ein individuelles Merkmal eines Pneumokokkenstammes darstellt, sollte die Bestimmung der maximalen Kompetenz bei der Charakterisierung eines Stammes immer miteinbezogen werden.

2.6.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen von *S. pneumoniae* wurden 6-12 ml C-Medium, versetzt mit BSA (Endkonzentration: 0,072 %), mit einer Vorkultur inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer Nephelo von 30-40 (Phase der maximalen Kompetenz bei *S. pneumoniae* R6) wurden Zellen entnommen und in einer Transformation (siehe 2.6.6.2) eingesetzt. Alternativ wurden die kompetenten Zellen aliquotiert und als Glycerinkulturen (siehe 2.6.1) bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.6.2 Transformation

Zur Transformation wurden 20 μl kompetente Zellen mit 180 μl C-Medium, 1,62 μl BSA (8 %) und 50-500 ng der zu transformierenden DNA gemischt. Als Negativkontrolle diente ein gleicher Ansatz, der aber statt der DNA das entsprechende Volumen TE-Puffer enthielt. Zur Aufnahme der DNA und anschließenden Rekombination wurden der Transformationsansatz und die Negativkontrolle für 30 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h im 37 °C-Wasserbad, um die phänotypische Expression des transformierten Resistenzmarkers

zu ermöglichen. Je 100 µl des Transformationsansatzes und der Negativkontrolle wurden unverdünnt und in geeigneten Verdünnungen (Verdünnung in C-Medium) auf Blutagarplatten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum (siehe Tab. 2.22) und auf Blutagarplatten ohne Antibiotikum (Positivkontrolle) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 24-48 h bei 30 oder 37 °C. Einzelkolonien wurden nach spätestens 48 h Inkubation sowohl auf Blutagarplatten mit Selektionsantibiotikum in der zur Selektion verwendeten Konzentration, als auch auf Agarplatten ohne Antibiotikum ausgestrichen. Nur diejenigen Klone, welche auf beiden Platten Wachstum zeigten, waren zur Weiterbearbeitung geeignet. Erfolgte die Selektion mit β -Laktamen, so wurde zur Konservierung (siehe 2.6.1) dieser Klone Medium mit Kultur von den Platten ohne Antibiotikum angeimpft, bei der Selektion mit sonstigen Antibiotika wurde zum Animpfen auf die Platten mit Antibiotikum zurückgegriffen.

Zur Transformation nichtkompetenter Labormutanten wurde dem Transformationsansatz zur Komplementation zusätzlich synthetisches CSP (Endkonzentration: 100 ng/ml) zugesetzt.

2.6.6.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung von Mutanten wurde deren genetische Kompetenz von der frühen exponentiellen Wachstumsphase bis zum Eintritt in die stationäre Phase durch Bestimmung der Transformationseffizienz analysiert. Hierzu wurden 12 ml C-Medium mit Zusatz von 108 µl BSA (8 %) mit 0,6 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Ab einer Nephelo von 5 wurden bei definierten Zelldichten bis zur stationären Phase (Nephelo von > 100) 50 µl-Aliquots entnommen, mit Glycerin versetzt (Endkonzentration: ca. 15 % (v/v)), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. 20 µl der derart erhaltenen Aliquots wurden jeweils mit 100-600 ng chromosomaler *S. pneumoniae* amiA9-DNA transformiert (siehe 2.6.6.2). Die Selektion erfolgte gemäß dem Selektionsmarker dieses Stammes mit 200 µg/ml Streptomycin. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurde die Transformationseffizienz als prozentualer Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl bezogen auf 1 ml Kultur für jedes Aliquot berechnet.

Zur Überprüfung der Kompetenz wurden standardmäßig entweder 100-500 ng chromosomale amiA9-DNA oder aber 100 ng eines 600 bp großen PCR-Produkts, welches den amiA9-Resistenzmarker enthält, in einem zusätzlichen Ansatz parallel transformiert. Falls bekannt, wurden zudem immer die Aliquots mit den höchsten Transformationseffizienzen in Transformationsexperimenten eingesetzt.

2.6.7 Transformation von *Escherichia coli*

Viele Bakterien wie *E. coli* sind unter natürlichen Bedingungen nur schlecht oder gar nicht transformierbar und müssen deswegen zur Induktion der Kompetenz einer speziellen Behandlung unter-

zogen werden. Dabei stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit die Methode der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) angewandt wurde, da mit dieser eine weitaus höhere Kompetenz erzielt wird als mit anderen Verfahren. Bei der Transformation durch Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Impuls ausgesetzt, wodurch die Zellmembran permeabilisiert wird und DNA-Moleküle eindringen können.

2.6.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (Sambrook *et al.*, 1989) wurden 200 ml LB-Medium mit 4 ml Vorkultur inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gehalten und anschließend für 15 min bei 7000 Upm und 4 °C abzentrifugiert (Biofuge® Stratos) (Heraeus Instruments). Es folgten zwei Waschschriffe mit H₂O_{millipore}, bei denen jeweils für 15 min bei 7000 Upm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 ml (1. Waschschriff) bzw. 50 ml (2. Waschschriff) eiskaltem H₂O_{millipore} resuspendiert wurde. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschriffe mit Glycerin an, bei denen jeweils für 15 min bei 7000 Upm und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml (1. Waschschriff) bzw. 800 µl (2. Waschschriff) eiskaltem Glycerin (10 % (v/v)) aufgenommen wurde. Die derart erhaltene Zellsuspension wurde in 45 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.6.7.2 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden 45 µl elektrokompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz vermischt, und der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Nach einer kurzen Inkubation für 1 min auf Eis erfolgte die Elektroporation mithilfe eines Elektroporationsgerätes (Gene Pulser™) (Bio-Rad Laboratories) unter den folgenden Pulsbedingungen: Spannung U = 2100 V, Kapazität C = 25 µF, Widerstand R = 200 Ω. Dabei betrug die Pulsdauer 4,7-4,8 ms. Nach dem Pulsen wurden sofort 200 µl vorgewärmtes LB-Medium in die Küvette gegeben, die Suspension in ein kleines Reagenzglas mit 800 µl ebenfalls vorgewärmtem LB-Medium transferiert und zur Regeneration der Zellen für 1 ½ h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes unverdünnt und in geeigneten Verdünnungen (Verdünnung in LB-Medium) auf LB-Platten mit dem zur Selektion verwendeten Antibiotikum (siehe Tab. 2.22) ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum in der zur Selektion verwendeten Konzentration überpickt, in LB-Medium unter Selektionsdruck angezogen und konserviert (siehe 2.6.1).

2.6.7.3 Blau-Weiß-Selektion

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten pGEM[®]-T Easy-Klonierungskit (Promega) erfolgte die Identifizierung rekombinanter Klone mittels Blau-Weiß-Selektion. Der dabei eingesetzte Vektor pGEM[®]-T Easy enthält das Gen *lacZ'*, welches für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase codiert. Dieses Fragment ist inaktiv, solange es nicht durch das C-terminale ω -Fragment, das von bestimmten Wirtsstämmen codiert wird (*lacZ* Δ M15), komplementiert wird (α -Komplementation). Die aktive β -Galaktosidase setzt das Laktoseanalogon X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG und Luftsauerstoff zu dem farbigen Produkt 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo um, was in einer Blaufärbung der Kolonien resultiert. Im *lacZ'*-Gen des Vektors befindet sich die MCS. Durch Insertion eines zu klonierenden DNA-Fragments in die MCS wird das *lacZ'*-Gen unterbrochen und das N-terminale α -Fragment kann nicht mehr exprimiert werden. Die aktive β -Galaktosidase wird nicht gebildet und die Kolonien sind weiß. Demnach können rekombinante Klone, in denen das *lacZ'*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört ist (weiße Kolonien), von Klonen ohne Insertion (blaue Kolonien) nach Inkubation mit X-Gal und IPTG unterschieden werden.

Bei der Verwendung des pGEM[®]-T Easy-Klonierungskits wurde die Transformation nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden neben dem Ligationsansatz mit Vektor und zu klonierendem Insert sowohl ein Ansatz mit Vektor und 542 bp großem Kontrollinsert (Positivkontrolle) als auch ein Ansatz, der nur den Vektor enthielt (Hintergrundkontrolle) transformiert. Die Blau-Weiß-Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) und IPTG (0,5 mM) über Nacht bei 37 °C. Eine anschließende Inkubation für 2-3 h bei 4 °C erleichterte die Differenzierung von weißen und blauen Kolonien. Weiße Einzelkolonien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) und IPTG (0,5 mM) überpickt, in Flüssigmedium mit Ampicillin (100 μ g/ml) kultiviert und konserviert (siehe 2.6.1).

2.6.7.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde der Vektor pBR322 (Roche) verwendet. Die zu testenden *E. coli*-Zellen wurden mit 50 ng dieses Vektors transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) und IPTG (0,5 mM) (Transformationsbedingungen) selektioniert. Die Transformationseffizienz ergab sich aus der Anzahl der Kolonien je μ g eingesetzter Vektor-DNA, wobei die Effizienz im Idealfall zwischen 10^8 und 10^{10} Transformanten/ μ g DNA liegen sollte.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren

2.7.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Isolierung chromosomaler DNA beruht auf einer Methode von Marmur (Marmur, 1961). Es handelt sich hierbei um eine schnelle Methode, die allerdings die Gefahr der Fragmentierung der chromosomalen DNA durch Scherkräfte birgt.

Zur Durchführung wurden 6 ml einer *S. pneumoniae*-Kultur bei einer Nephelo zwischen 60 und 80 für 10 min bei 7500 Upm und 4 °C abzentrifugiert (Biofuge® Stratos) (Heraeus Instruments). Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 100 µl NaCl (0,9 %) resuspendiert. Nach Überführung der Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß wurde erneut für 1 min bei 14 000 Upm pelletiert (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf). Das Pellet wurde entweder bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren oder aber in 180 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl Ribonuklease (RNase) -Lösung (10 mg/ml) wurde gemischt und das Reaktionsgefäß in ein 37 °C-Wasserbad gestellt. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl SDS (2 %) zugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nach Eintritt der vollständigen Lyse (nach ca. 8 min) erfolgte die Zugabe von 100 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 10 min. Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung einer Phenolisierung unterzogen. Hierbei wurden zu dem Lysat 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und der Ansatz für 30 min auf einem Schüttler gerüttelt (Mixer 5432) (Eppendorf) (Vortex-Genie® 2) (Scientific Industries). Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 14 000 Upm (Centrifuge 5415 C) (Eppendorf), wurde die wässrige Oberphase vorsichtig abgehoben und die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion solange wiederholt, bis die Interphase klar war. Alternativ erfolgte zunächst eine Extraktion mit Phenol, an die sich dann Extraktionen mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) anschlossen. Zur Fällung der DNA wurde die Oberphase mit 500 µl Isopropanol (100 %, pro analysi (p.a.)) versetzt, der Ansatz mehrmals invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 14 000 Upm sedimentiert (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf) und das DNA-Pellet zweimal mit 200 µl Ethanol (70 %, p.a.) gewaschen. Anschließend wurde die DNA für 10-20 min bei Raumtemperatur oder in einer SpeedVac (UNIVAPO 100 H) (UniEquip) getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Hierzu erfolgte eine Inkubation für 1 h im 37 °C-Wasserbad bzw. über Nacht bei 4 °C. Die derart präparierte chromosomale DNA wurde für kurze Zeit bei 4 °C, über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert. Die zur Isolierung der chromosomalen DNA eingesetzten Lösungen sind Tab. 2.24 zu entnehmen.

Tab. 2.24: Lösungen zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*.

Komponente	Menge/Konzentration
NaCl	0,9 %
autoklavieren	
TE-Puffer	
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
autoklavieren	
RNase (10 mg/ml)*	
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	10 mM
RNase A (Roth)	15 mM
15 min bei 100 °C kochen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, bei -20 °C lagern	
SDS	2 %
Proteinase K (AppliChem)	20 mg/ml
bei -20 °C lagern	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	
Phenol	25 Vol.
Chloroform	24 Vol.
Isoamylalkohol	1 Vol.
bei 4 °C dunkel lagern	
Isopropanol p.a.	100 %
EtOH p.a.	70 %

* Alternativ wurde eine fertige RNase A (100 mg/ml) (Qiagen) verwendet.

Abk.: EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid), Vol. (Volumen)

2.7.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden 4 ml einer Vorkultur für 10 min bei 5400 Upm und 4 °C ab-

zentrifugiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben präpariert. Um nachfolgende Enzymreaktionen nicht zu stören, wurde die Elution der DNA statt mit dem mitgelieferten Tris-HCl-Puffer mit H₂O durchgeführt.

2.7.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die im Folgenden in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden sollten, mußten vor der weiteren Verwendung aufgereinigt werden, um DNA-Polymerase, Salze, überschüssige Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und Oligonukleotide zu entfernen. Die Aufreinigung wurde mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit (Macherey-Nagel), dem JETquick PCR Product Purification Spin Kit/250 (Genomed) oder dem QIAquick Spin Kit (Qiagen) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

2.7.1.4 Elution von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Zur Entfernung von unerwünschten Nebenprodukten aus PCR-Ansätzen und zur Aufreinigung von PCR-Produkten, die transformiert werden sollten, wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel mit entsprechender Prozentigkeit aufgetragen (siehe 2.7.1.6). Die Elektrophorese erfolgte bei einer geringeren Spannung (80 V), um eine bessere Auftrennung zu erzielen. Nach Färbung mit Ethidiumbromid (ca. 0,5 µg/ml) und einer kurzen Entfärbung mit H₂O wurde die erwünschte DNA-Bande möglichst scharf und unter kurzer Exposition mit langwelligem UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Alternativ wurde die Bande ohne Färbung und anschließender Exposition mit UV-Licht ausgeschnitten. Dabei erfolgte die Visualisierung der DNA-Bande mithilfe von Markierungen, die an die Positionen angebracht wurden, an denen sich die betreffende Bande in zwei flankierenden Agarosestücken, die im Gegensatz zu dem zu präparierenden Agarosestück gefärbt wurden, befand. Für die Extraktion der DNA aus der Agarose und die nachfolgende Aufreinigung wurde in beiden Fällen das NucleoSpin[®] Extract II Kit (Macherey-Nagel) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

2.7.1.5 Isolierung von RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Generell wurden bei der Handhabung von RNA zusätzliche Maßnahmen getroffen, um eine Degradation durch RNasen zu vermeiden. Es wurde ein gesonderter Satz von Glaspipetten, Eppendorfreaktionsgefäßen und Lösungen verwendet. Für automatische Pipetten wurden RNase-freie Spitzen mit Filter (filter tips) (Greiner bio-one) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen mit Handschuhen und möglichst zügig bei 60 °C oder auf Eis durchgeführt. Lösungen und Reaktionsgefäße wurden mindestens zweimal autoklaviert. Oberflächen von Glaswaren und Gerätschaften wurden mit RNaseZAP[®] (Ambion) behandelt. Die Lagerung der RNA

erfolgte in Diethylpyrocarbonat (DEPC) -H₂O bei -80 °C, wobei zu häufige Auftau- und Einfrier-Zyklen vermieden wurden.

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA beruht auf der sogenannten „Hot Phenol Methode“ (Maes und Messens, 1992). Hierbei konnten Ausbeuten von bis zu 600 µg RNA aus 100 ml Kultur mit einer Nephelo von 40 erzielt werden, eine Menge, die gerade für die durchgeführten Microarray-Experimente erforderlich waren.

Zur Gewinnung der Zellen wurden zunächst einmal 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes C-Medium 1:20 mit einer Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer Nephelo von 40-50 inkubiert. Hiervon wiederum wurden 145 ml auf 37 °C vorgewärmtes C-Medium 1:30 inokuliert und in 250 ml-Schottflaschen im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Zur Dokumentation des Wachstums erfolgte die Entnahme von 6 ml Kultur in einem Reagenzglas und die Messung der Zelldichte in einem Nephelometer. Nach Erreichen einer Nephelo von 40 wurden die Zellen durch Zentrifugation für 6 min bei 8000 Upm und Raumtemperatur (19 °C) (zur Vermeidung der Induktion von Kälteschockgenen) geerntet (Biofuge[®] Stratos) (Heraeus Instruments). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Isolierung der RNA wurde das Bakterienpellet ohne Auftauen in 4 ml auf 60 °C vorgewärmten Na-Acetat-EDTA (NAE) -gesättigtem Phenol-Chloroform (6:1) zügig resuspendiert und für 5 min bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml auf 60 °C vorgewärmten Na-Acetat-EDTA-SDS (NAES) -Puffer und mehrmaligem Invertieren bzw. kurzem Vortexen erfolgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 60 °C, wobei zwischendurch nochmals invertiert wurde. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurde zur Phasentrennung für 8 min bei 8000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein Phase Lock Gel[™]-Röhrchen (MaXtract High Density) (Qiagen) überführt, welches mit 4 ml Phenol/Chloroform (6:1) versetzt worden war, für 2 min invertiert und für 8 min bei 8000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Phase Lock Gel[™]-Röhrchen transferiert und die Phenolextraktion wiederholt. Die wässrige Phase wurde schließlich in einem 15 ml-Greiner-Röhrchen mit 4 ml Isopropanol (100 %, p.a.) und 400 µl Natriumacetat (3 M, pH 5) versetzt, durch Invertieren gemischt und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation für 40 min bei 8000 Upm und 4 °C gewonnen, das RNA-Pellet mit 3 ml EtOH (70 %, p.a.) gewaschen, in einem Exsikkator (Kartell[®]) (Noviglio) für 30-45 min getrocknet und in 500 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die zur RNA-Isolierung verwendeten Lösungen sind in Tab. 2.25 aufgelistet.

Tab. 2.25: Lösungen zur Isolierung von RNA aus *Streptococcus pneumoniae*.

Komponente	Menge/Konzentration
NAE-Puffer	
Na-Acetat pH 5,1	50 mM
EDTA pH 8	10 mM
autoklavieren	
NAES-Puffer	
Na-Acetat pH 5,1	50 mM
EDTA pH 8	10 mM
SDS	1 %
Phenol/Chloroform (6:1)	
Aqua-Phenol	6 Vol.
Chloroform	1 Vol.
für NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform dieses mit NAE-Puffer äquilibrieren	
bei 4 °C dunkel lagern	
Na-Acetat pH 5	3 M
autoklavieren	
Isopropanol p.a.	100 %
EtOH p.a.	70 %

Zur Entfernung der chromosomalen DNA, die die spätere Hybridisierung bei Microarray-Experimenten verfälschen könnte, wurde die RNA-Lösung einer Desoxyribonuklease (DNase) -Behandlung unterzogen. Ein Ansatz zum DNase-Verdau ist in Tab. 2.26 aufgeführt. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurde die RNA unter Verwendung des RNeasy® Midi-Kits (50) (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dabei erfolgten die Zentrifugationsschritte bei 4000 Upm und 4 °C und die RNA wurde zweimal mit jeweils 150 µl RNase-freiem H₂O eluiert.

Tab. 2.26: Zusammensetzung eines Ansatzes zum DNase-Verdau.

Komponente	Menge
RNA-Lösung	450 µl
DNase-Puffer (10x)	50 µl
DNase (2 U/µl)	10 µl
Inkubation für 10 min bei 37 °C	

Um die präparierte RNA auf Anzeichen einer Degradation oder auf Rückstände von DNA hin zu untersuchen, wurde sowohl eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.7.1.6), als auch eine Kontroll-PCR (siehe 2.7.2.4) durchgeführt.

2.7.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren. Diese wandern aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. -strecke der Fragmente ist dabei abhängig von deren Größe und Konformation, von der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration des Gels. Die Visualisierung der gelelektrophoretisch getrennten Nukleinsäure-Fragmente geschieht durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid, das in die Nukleinsäure interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

Die Agarosekonzentration wurde abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente gewählt (Sambrook *et al.*, 1989); im Allgemeinen betrug die Konzentration 1 %. Zur Durchführung wurde die Agarose (SeaKem LE) (Biozym) durch Aufkochen in Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer (1x) in der Mikrowelle gelöst und in einen mit Klebeband abgedichteten Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach vollständiger Polymerisation der Gelmatrix wurden das Klebeband und die Kämmen entfernt, der Gelschlitten mit Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer (1x) gefüllt, sodass das Gel knapp bedeckt war. In die Geltaschen wurden maximal 12 µl der mit Probenpuffer (6x) versetzten Proben pipettiert. Für präparative Gele wurden mehrere Zähne eines Kammes abgeklebt, sodass Geltaschen entstanden, die mit einem größeren Probenvolumen befüllt werden konnten. Als Größenstandard diente der Ready Load™ 1 kb Ladder (Invitrogen), der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas), der Quick-Load™ 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs) oder der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas), von dem jeweils etwa 0,4 µg aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung zwischen 80 und 130 V solange durchgeführt, bis der Farbstoffmarker im Probenpuffer drei Viertel des Gels durchlaufen hatte. Nach der Elektrophorese erfolgte eine Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad (ca. 0,5 µg/ml) für 20 min und eine Entfärbung in H₂O für 5 min. Anschließend konnten die Nukleinsäuren im Gel auf einem Transilluminator (Oncor® M-20) (Appligene) mit UV-Licht sicht-

bar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden (Video Copy Processor P68E) (Mitsubishi).

Bei der Elektrophorese von RNA wurde prinzipiell wie bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA verfahren, jedoch wurden alle mit der RNA direkt oder indirekt in Kontakt kommende Oberflächen zuvor gründlich gereinigt und mit RNaseZAP® (Ambion) behandelt. Zudem wurden Agarosegele erst kurz vor Verwendung gegossen und frisch angesetzter Laufpuffer verwendet. Als Probenpuffer wurde ein RNA-Loading Dye (2x) (Fermentas) eingesetzt, der bereits Formamid zur Denaturierung der RNA und Ethidiumbromid enthält. Durch letzteres reduzierte sich die Färbedauer von 20 auf 10 min. Die zur Agarose-Gelelektrophorese eingesetzten Lösungen sind in Tab. 2.27 gezeigt.

Tab. 2.27: Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Menge/Konzentration
TAE-Puffer (50x)	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA pH 8 (0,5 M)	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
vor Gebrauch 1:50 verdünnen	
DNA-Probenpuffer (6x)*	
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol FF	0,25 %
Glycerin	15 % (v/v)
bei 4 °C lagern	
Ethidiumbromid	ca. 0,5 µg/ml

* Alternativ wurde ein fertiger DNA-Probenpuffer (6x) (Fermentas) verwendet.

2.7.1.7 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte entweder mittels UV-Absorptionsspektrometrie über die Messung der OD bei einer Wellenlänge von 260 nm oder aber mittels Agarose-Gelelektrophorese über den Vergleich von Bandenintensitäten. Bei der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorptionsspektrometrie wurde die Absorption von 1 µl DNA-Lösung bei 260 nm in einem Spektralphotometer (NanoDrop®) (Software: NanoDrop ND-1000, Version 3.3.1) (NanoDrop Technologies Inc.) gemessen. Dabei gilt folgender Zusammenhang:

dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 ng/μl

ssDNA: 1 OD₂₆₀ = 33 ng/μl.

Als Referenz diente das entsprechende Lösungsmittel der Probe. Die Reinheit der DNA-Präparation wurde anhand der automatisch berechneten Verhältnisse OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ überprüft, die im Idealfall bei 1,8 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) und zwischen 2,0-2,2 (OD₂₆₀/OD₂₃₀) liegen sollten. Dabei ist das OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis ein Maß für Protein- oder Phenolkontaminationen, während das OD₂₆₀/OD₂₃₀-Verhältnis Kontaminationen von Proteinen, Phenol, EDTA oder Polysacchariden indiziert.

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarose-Gelelektrophorese diente der Vektor pBR322 (250 ng/μl) (Roche), der in bekannten Konzentrationen (200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng/12 μl) zusammen mit einem Aliquot der DNA-Probe auf ein Agarosegel aufgetragen wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid konnte im UV-Licht durch Vergleich der Bandenintensitäten des Konzentrationsstandards und der Probe deren Konzentration abgeschätzt werden.

Die RNA-Konzentration wurde ebenfalls mittels UV-Absorptionsspektrometrie in einem Spektralphotometer ermittelt. Hierzu wurde die Absorption von 1 μl RNA-Lösung und als Referenz von 1 μl RNase-freiem H₂O bei 260 nm gemessen. Dabei basiert die Konzentrationsbestimmung auf dem folgenden Zusammenhang:

ssRNA: 1 OD₂₆₀ = 40 ng/μl.

Auch hier konnte der Reinheitsgrad der RNA-Präparation anhand der Verhältnisse OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ beurteilt werden, die sich idealerweise bei 2,0 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) und zwischen 2,0-2,2 (OD₂₆₀/OD₂₃₀) bewegen sollten.

2.7.2 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

2.7.2.1 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren und für Ligationen wurden Plasmide und PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische, meist kurze palindromische Basensequenzen in einem doppelsträngigen DNA-Molekül erkennen und schneiden können, wodurch DNA-Fragmente mit definierten Enden (glatten oder kohäsiven Enden) entstehen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *AscI* und *FseI*, sowie die entsprechenden Puffer, wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. *EcoRI* wurde für den analytischen Restriktionsverdau von Plasmiden herangezogen, während der präparative Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit *AscI* und *FseI* erfolgte. Die Enzyme wurden nach den

Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Gesamtvolumen für einen analytischen Restriktionsansatz betrug 20 μl , für einen präparativen Restriktionsansatz 60-70 μl (Tab. 2.28). Analytische Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert, präparative über Nacht bei 37 °C. In beiden Fällen erfolgte eine anschließende Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C. Analytische Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.7.1.6) auf ihre Vollständigkeit hin überprüft. Präparative Ansätze, die im Folgenden zur Ligation eingesetzt werden sollten, wurden mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt (siehe 2.7.1.3) und ebenfalls einer gelelektrophoretischen Analyse (siehe 2.7.1.6) unterzogen.

Tab. 2.28: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.

Restriktionsansatz	Komponente	Menge
Analytischer	Puffer (10x)	2 μl
	Plasmid-DNA (100-400 ng/ μl)	2,5 μl , 5 μl
	<i>EcoRI</i> (10 U/ μl)	2 μl
	H ₂ O	ad 20 μl
Präparativer (Einfachverdau)	Puffer (10x)	6 μl , 7 μl
	BSA (1 mg/ml)	-, 1 μl
	PCR-Produkt (30-50 ng/ μl)	48 μl
	<i>AscI</i> (10 U/ μl), <i>FseI</i> (2 U/ μl)	2 μl , 10 μl
	H ₂ O	ad 60 μl , ad 70 μl
Präparativer (Doppelverdau)	Puffer (10x)	7 μl
	BSA (1 mg/ml)	1 μl
	PCR-Produkt (30 ng/ μl)	46 μl
	<i>AscI</i> (10 U/ μl)	2 μl
	<i>FseI</i> (2 U/ μl)	10 μl
	H ₂ O	ad 70 μl
Inkubation für 2 h (Analytischer Restriktionsansatz) bzw. über Nacht (Präparativer Restriktionsansatz) bei 37 °C, Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C		

Abk.: U (Unit)

2.7.2.2 Ligation

Zur Verknüpfung von Nukleinsäuremolekülen werden Ligasen eingesetzt, die die Bildung der kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von DNA- und RNA-Molekülen katalysieren.

In dieser Arbeit wurde zur Ligation von DNA-Fragmenten die T4-DNA-Ligase verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Ligationen von Inserts mit dem pGEM[®]-T Easy-Vektor erfolgten mithilfe des pGEM[®]-T Easy-Klonierungskits (Promega), wobei zur Kontrolle neben dem Ligationsansatz mit Vektor und zu klonierendem Insert sowohl ein Ansatz mit Vektor und 542 bp großem Kontrollinsert (Positivkontrolle) als auch ein Ansatz, der nur den Vektor enthielt (Hintergrundkontrolle) pipettiert und anschließend transformiert wurden. Das optimale molare Insert-Vektor-Verhältnis wurde nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation verwendet (siehe 2.6.7.2).

Zur Ligation restringierter PCR-Produkte wurden diese in äquimolaren Mengen eingesetzt und der Ansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert. Sollten drei PCR-Produkte ligiert werden, so geschah das entweder in einem einzelnen Ligationsansatz oder alternativ in zwei separaten Ansätzen. Zur Amplifikation des ligierten Produkts wurden 1 µl des jeweiligen Ligationsansatzes ohne weitere Behandlung einer nachfolgenden PCR unterzogen (siehe 2.7.2.4). Die Zusammensetzung eines Ansatzes zur Ligation von Insert und Vektor bzw. von PCR-Produkten ist der Tab. 2.29 zu entnehmen.

Tab. 2.29: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Ligationsansatz	Komponente	Menge
Vektor - Insert	T4-DNA-Ligase-Puffer (2x)	5 µl, 8µl
	pGEM [®] -T Easy Vektor-DNA (50 ng/µl) (Promega)	1 µl
	PCR-Produkt (10-25 ng/µl)*	3 µl, 6 µl**
	T4-DNA-Ligase (3 U/µl) (Promega)	1 µl
Inkubation über Nacht bei 4 °C		
PCR-Produkt - PCR-Produkt ***	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	2 µl
	1. PCR-Produkt (20 ng/µl)****	5 µl
	2. PCR-Produkt (25 ng/µl)****	4 µl
	3. PCR-Produkt (30 ng/µl)****	3 µl
	T4-DNA-Ligase (4 U/µl)	1 µl
Inkubation über Nacht bei 16 °C		

* PCR-Produkt nach Herstellung von 3'-A-Überhängen (siehe 2.7.2.3)

** Das optimale molare Insert-Vektor-Verhältnis wurde mithilfe der Herstellerangaben ermittelt.

*** Alternativ wurden jeweils zwei PCR-Produkte in Einzelansätzen ligiert und die Ligationsprodukte in einer anschließenden PCR (siehe 2.7.2.4) zusammengeführt.

**** verdautes, aufgereinigtes PCR-Produkt (siehe 2.7.2.1)

2.7.2.3 Herstellung von 3'-A-Überhängen

Zur TA-Klonierung wurde das pGEM[®]-T Easy-Klonierungskit (Promega) verwendet. Der linearisierte pGEM[®]-T Easy-Vektor besitzt 3'-T-Überhänge innerhalb der MCS, sodass DNA-Fragmente mit 3'-A-Überhängen kloniert werden können. PCR-Produkte, die mit der *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert wurden, können direkt in einer Ligation mit dem Vektor eingesetzt werden, da dieses Enzym Fragmente mit einem unspezifischen 3'-Überhang von einer Base, meist einem Adenosin erzeugt. Zur Klonierung von PCR-Produkten, die mit einer DNA-Polymerase mit 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, also Korrekturleseaktivität (proofreading) amplifiziert wurden, ist jedoch zuvor die Herstellung von 3'-A-Überhängen erforderlich, da ein solches Enzym Fragmente mit glatten Enden generiert.

Die in dieser Arbeit zu klonierenden PCR-Produkte wurden mit der iProof[™] High-Fidelity-DNA-Polymerase (Bio-Rad Laboratories), einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion hergestellt, sodass die anschließende Klonierung in dem Vektor pGEM[®]-T Easy ein Anfügen von 3'-A-Überhängen an die Fragmente voraussetzte. Hierzu wurde von zwei verschiedenen Protokollen Gebrauch gemacht. Bei der ersten Methode wurde nach der PCR das Produkt durch ein präparatives Gel aufgereinigt (siehe 2.7.1.4) und in einem Reaktionsansatz mit *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar[™] (Eurogentec), dem entsprechenden Puffer, MgCl₂ und ATP eingesetzt (Tab. 2.30).

Tab. 2.30: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Herstellung von 3'-A-Überhängen.

Herstellung von 3'-Überhängen	Komponente	Menge
Post-PCR-Aufreinigung	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Red GoldStar [™] -Puffer (10x)	1 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
	dATP (1 mM) (Peqlab)	2 µl
	PCR-Produkt (10 ng/µl)*	4,4 µl
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Red GoldStar [™] (5 U/µl)	1 µl
Inkubation für 30 min bei 70 °C		
Post-PCR	PCR-Ansatz	50 µl
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Red GoldStar [™] (5 U/µl)	0,2 µl
Inkubation für 10 min bei 72 °C, auf Eis stellen, Aufreinigung durch präparatives Gel		

* durch präparatives Gel aufgereinigtes PCR-Produkt (siehe 2.7.1.4)

Abk.: dATP (Desoxyadenosintriphosphat)

Nach einer Inkubation für 30 min bei 70 °C wurde der Ansatz ohne weitere Behandlung zur Ligation mit dem Vektor verwendet (siehe 2.7.2.2). Bei der zweiten Methode wurde der PCR-Ansatz nach Durchführung der PCR auf Eis gestellt, *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben (Tab. 2.30)

und für 10 min bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut auf Eis gehalten, durch ein präparatives Gel aufgereinigt (siehe 2.7.1.4) und das modifizierte aufgereinigte PCR-Produkt mit dem Vektor ligiert (siehe 2.7.2.2).

2.7.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Methode der PCR (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht die gezielte *in vitro*-Amplifikation eines bestimmten DNA-Fragments. Bei der PCR synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase, ausgehend von zwei synthetischen Oligonukleotiden (Primern) (siehe Tab. 2.3), an einer einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) den dazu komplementären Strang. Dabei werden zwei Oligonukleotide gegenläufiger Orientierung benötigt, welche das zu amplifizierende Fragment begrenzen. Die Reaktion besteht aus drei aufeinanderfolgenden temperaturabhängigen Schritten. Im ersten Schritt wird die zu amplifizierende doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen (94-98 °C) in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer an die ihnen komplementären Sequenzabschnitte der einzelsträngigen DNA bei einer wieder herabgesetzten, Primer-abhängigen Temperatur (Annealing). Im dritten Schritt wird bei einer für die DNA-Polymerase optimalen Temperatur (meist 72 °C), ausgehend von den 3'-OH-Enden der Primer ein zur Template-DNA komplementärer neuer DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Durch die mehrfache, meist 29-34fache Wiederholung dieses aus drei Reaktionsschritten bestehenden Zyklus erreicht man ausgehend von einer geringen Anzahl an Template-Molekülen eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde – je nach Verwendungszweck der PCR-Produkte – auf verschiedene DNA-Polymerasen zurückgegriffen. Für eine PCR zur Sequenzierung oder Überprüfung von Genomintegrationen wurde standardmäßig die *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar™ (Eurogentec) verwendet. Dieses Enzym stammt aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* und besitzt neben der 5'→3' -DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'→3' -Exonukleaseaktivität. Bei einer PCR zur chromosomalen Modifikation (gerichteten Mutagenese, Klonierung, Inaktivierung oder Deletion von Genen) war eine niedrige Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide erforderlich. Hierzu wurde im Allgemeinen die iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase (Bio-Rad Laboratories) herangezogen, die im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase zusätzlich eine 3'→5' -Exonukleaseaktivität aufweist, welche eine Korrekturleseaktivität (proofreading) erlaubt und demnach eine verminderte Fehlerrate gewährleistet. Zudem zeigt dieses Enzym auch eine höhere Prozessivität und wurde deswegen zur Amplifikation großer DNA-Fragmente (> 3 kilobases (kb)) und für schwierige Amplifikationen eingesetzt. Neben der iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase wurde auch die *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet, die ebenfalls über eine Korrekturleseaktivität verfügt, aber eine deutlich geringere Prozessivität aufweist.

Die Zusammensetzung eines PCR-Standardansatzes und -programms richtete sich jeweils nach den Herstellerempfehlungen und ist den Tab. 2.31 und Tab. 2.32 zu entnehmen.

Tab. 2.31: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Enzym	Komponente	Menge
Taq-DNA-Polymerase Red GoldStar™	Puffer (10x)	10 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	16 µl
	dNTP-Mix (10 mM) (Peqlab)	4 µl
	Primer 1 (10 µM)	1 µl
	Primer 2 (10 µM)	1 µl
	Template-DNA	50-500 ng
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Red GoldStar™ (5 U/µl)	0,5 µl
	H ₂ O	ad 100 µl
iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase	iProof™ HF-Puffer (5x)	10 µl
	MgCl ₂ (50 mM)*	1 µl
	dNTP-Mix (10 mM) (Peqlab)	1 µl
	Primer 1 (10 µM)	1 µl
	Primer 2 (10 µM)	1 µl
	Template-DNA	50-500 ng
	iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
	H ₂ O	ad 50 µl
<i>Pfu</i>-DNA-Polymerase	Puffer (10x)	10 µl
	dNTP-Mix (10 mM) (Peqlab)	1,6 µl
	Primer 1 (10 µM)	2,5 µl
	Primer 2 (10 µM)	2,5 µl
	Template-DNA	50-200 ng
	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	2 µl
	H ₂ O	ad 100 µl

* Zusatz bei schwierigen Amplifikationen, z. B. bei großen Amplikons (> 3 kb)

Dabei lag in der Regel die Annealing-Temperatur 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m (melting Temperature) der eingesetzten Primer. Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt, wobei die *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar™ für

die Amplifikation eines 1 kb großen DNA-Fragments 1 min benötigt, die *Pfu*-DNA-Polymerase 1-2 min und die iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase 15-30 s. Die Schritte 2 bis 4 wurden jeweils 29-34mal wiederholt, sodass insgesamt 30-35 Zyklen durchlaufen wurden. Für alle drei DNA-Polymerasen wurden die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Die PCR-Experimente wurden in dem T1 Thermocycler, dem Thermocycler TGradient oder TPersonal (Biometra) durchgeführt.

Tab. 2.32: Zusammensetzung eines PCR-Programms.

Enzym	Schritt	Temperatur	Dauer
<i>Taq</i>-DNA-Polymerase Red GoldStar™	1 initiale Denaturierung	94 °C	2 min
	2 Denaturierung	94 °C	30 s
	3 Annealing	Primer-T _m -5 °C	30 s
	4 Elongation	72 °C	1 min/kb
	5 finale Elongation	72 °C	10 min
	6 Pause	10 °C	∞
iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase	1 initiale Denaturierung	98 °C	30 s
	2 Denaturierung	98 °C	10 s
	3 Annealing	Primer-T _m -5 °C	30 s
	4 Elongation	72 °C	30 s/kb
	5 finale Elongation	72 °C	10 min
	6 Pause	10 °C	∞
Die Schritte 2 bis 4 wurden jeweils 29-34mal wiederholt.			
<i>Pfu</i>-DNA-Polymerase	1 initiale Denaturierung	94 °C	45 s
	2 Denaturierung	94 °C	45 s
	3 Annealing	Primer-T _m -5 °C	45 s
	4 Elongation	72 °C	1 min/kb
	5 finale Elongation	72 °C	10 min
	6 Pause	10 °C	∞
Die Schritte 2 bis 4 wurden 29mal wiederholt.			

Direkte PCR aus Glycerinkultur oder von Kolonie

Zur schnellen Überprüfung rekombinanter *S. pneumoniae*-Klone wurde im Allgemeinen auf die Isolierung von chromosomaler DNA verzichtet. Stattdessen wurden 200-500 µl Glycerinkultur für

5 min bei 15 000 Upm abzentrifugiert (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf), der Überstand verworfen und 1 µl des Pellets als Template in einer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar™ (Eurogentec) oder iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase (Bio-Rad Laboratories) eingesetzt (Tab. 2.31 und Tab. 2.32).

Zur schnellen Überprüfung rekombinanter *E. coli*-Klone wurde eine Kolonie-PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar™ durchgeführt (Tab. 2.31 und Tab. 2.32). Hierzu wurde ein Teil einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in einen PCR-Ansatz transferiert.

Überlappende PCR

Die Herstellung von Konstrukten zur Inaktivierung, Deletion oder Mutagenese von Genen in *S. pneumoniae* erfolgte unter anderem mithilfe einer überlappenden PCR. In dieser Variante einer herkömmlichen PCR wurden zwei oder mehrere zuvor generierte PCR-Produkte in einer PCR zusammengefügt. Hierzu mußten die Ausgangsfragmente an dem Ende, mit welchem sie mit einem weiteren Fragment verknüpft werden sollten, einen ca. 40 bp großen komplementären Bereich zu einem Ende des anderen Fragments besitzen und umgekehrt.

Tab. 2.33: Zusammensetzung eines PCR-Programms zur überlappenden PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
1 Denaturierung	98 °C	1 min
2 Annealing	60 °C	1 min
3 Elongation	72 °C	1 min
4 Pause: Zugabe der Primer	30 °C	3 min
5 Denaturierung	98 °C	30 s
6 Denaturierung	98 °C	5 s
7 Annealing	Primer-T _m -5 °C	10 s
8 Elongation	72 °C	30 s/kb
9 Elongation	72 °C	10 min
10 Pause	10 °C	∞

Die Schritte 6 bis 8 wurden 29mal wiederholt.

Zunächst wurden die Ausgangsprodukte in einer PCR mit Primern synthetisiert, die an einem Ende des jeweiligen Produkts eine ca. 20 bp große, zum Ende des anderen Produkts komplementäre Sequenz anfügten. Die derart hergestellten Ausgangsfragmente wurden in einer sogenannten „Auf-füllreaktion“ ohne die Anwesenheit von Primern verknüpft (Tab. 2.33, Schritt 1 bis 3). Hierbei lagerten sich die Fragmente mit ihren komplementären Enden aneinander und die fehlenden Gegenstränge wurden aufgefüllt, wobei die Enden der Fragmente als Primer fungierten.

Anschließend wurde ein Primerpaar zugegeben, welches zur Amplifikation des in der Auffüllreaktion erzeugten Volle-Länge-Fragments führte. Für diese Reaktionsabfolge wurde ein Thermocycler, wie in Tab. 2.33 gezeigt, programmiert. Es wurde die iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase (Bio-Rad Laboratories) unter Verwendung des in Tab. 2.31 aufgeführten Standardansatzes eingesetzt.

In den meisten Fällen wurde jedoch auf die zusätzlichen Schritte verzichtet und die überlappende PCR gemäß dem in Tab. 2.31 wiedergegebenen Standardprogramm mit iProof™ High-Fidelity-DNA-Polymerase durchgeführt.

Die Ausgangsprodukte wurden jeweils durch ein präparatives Gel aufgereinigt und in äquimolaren Mengen eingesetzt. Das jeweilige Volle-Länge-Fragment wurde ebenfalls durch ein präparatives Gel aufgereinigt (siehe 2.7.1.4), durch Ansequenzierung (siehe 2.7.2.6) überprüft und transformiert (siehe 2.6.6).

2.7.2.5 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurde in dieser Arbeit der BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet, der auf dem Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) beruht. Es handelt sich hierbei um eine enzymatische Methode, bei der die zu sequenzierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente mithilfe einer DNA-Polymerase dient. Die DNA wird zunächst in ihre einzelsträngige Form überführt und mit einem Oligonukleotid hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer wird der zur Matrize komplementäre Strang synthetisiert, wobei die Polymerisationsreaktion in Gegenwart der vier 2'-dNTPs und vier unterschiedlich fluorophormarkierter 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) stattfindet. Beim Einbau eines ddNTPs kommt es zum Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe kein weiteres Nukleotid mehr angefügt werden kann. Das Ergebnis ist eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge mit endständiger Fluorophormarkierung. Das Lesen der Sequenz erfolgt durch Detektion der markierten ddNTPs am 3'-Ende der DNA-Fragmente während ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung mittels eines Laseranregungs/Detektionssystems im Sequenzierautomaten.

Bei der hier angewandten Zyklus-Sequenzierung (Thermal Cycle Sequencing) (Sears *et al.*, 1992; Slatko, 1994) wird für die Sequenzierung die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer Reduktion der benötigten Templatemenge, im Reaktionsablauf bei höheren Temperaturen, durch den Sekundärstrukturen und GC-reiche Strukturen besser aufgelöst werden können, sowie in der Automatisierbarkeit.

Sequenzreaktion und -programm

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden diese aufgereinigt und in einem Standardansatz der Sequenzreaktion, wie er in Tab. 2.34 gezeigt ist, eingesetzt. Dabei war die Menge des zu

sequenzierenden Fragments abhängig von dessen Größe und der Art der Sequenzierung (einzelsträngig oder doppelsträngig) und richtete sich im Allgemeinen nach den Empfehlungen des Herstellers. Die Sequenzreaktion wurde in einem Thermocycler (T1 Thermocycler, Thermocycler TGradient oder Tpersonal) (Biometra) mit dem in Tab. 2.35 angegebenen Standardprogramm durchgeführt. Dabei wurden die Schritte 2 bis 4 insgesamt 25mal durchlaufen. Die Lagerung von Sequenzansätzen erfolgte bis zur Weiterverarbeitung im Dunkeln bei -20 °C.

Die *pbp2x*-, *pbp1a*-, *ciaH*- und *cpoA*-Gene der verwendeten *S. pneumoniae*-Stämme und hergestellten Mutanten wurden routinemäßig sequenziert, um erwünschte Mutationen zu verifizieren bzw. um das Vorhandensein unerwünschter Mutationen auszuschließen. Alle zur chromosomalen Modifikation von *S. pneumoniae* hergestellten Konstrukte wurden vor ihrer Transformation durch Sequenzierung überprüft. Die Bestätigung der korrekten Rekombination eines transformierten Fragments in erhaltenen Transformanten erfolgte durch PCR mit Primern stromauf- und abwärts der äußersten zu seiner Generierung verwendeten Primern, sowie Ansequenzierung der betroffenen Region im Genom. Anhand der Größe der generierten PCR-Produkte konnte ausgeschlossen werden, dass das Fragment an einer unerwünschten Stelle im Genom integriert hat.

Tab. 2.34: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Sequenzreaktion.

Komponente	Menge
BigDye [®] Terminator Ready Reaktionsmix v1.1, v3.1 (Applied Biosystems)	1 µl, 2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Template-DNA (PCR-Produkt)	x µl*
H ₂ O	ad 10 µl

* abhängig von der Konzentration und Größe der Template-DNA sowie von der Art der Sequenzierung (einzelsträngig oder doppelsträngig) (Herstellerangaben)

Abk.: v (version)

Tab. 2.35: Zusammensetzung eines Programms zur Sequenzreaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer
1 initiale Denaturierung	96 °C	2 min
2 Denaturierung	96 °C	30 s
3 Annealing	50 °C	15 s
4 Elongation	60 °C	4 min
5 Pause	4 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 24mal wiederholt.

Sequenzlauf

Die Aufreinigung der Sequenzreaktion, der Sequenzlauf in einem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sowie die Erfassung der Sequenzdaten erfolgte über den größten Zeitraum der Arbeit im Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern. Zu Beginn der Arbeit wurde die Sequenzierung von dem Sequenzierservice der Firma AGOWA vorgenommen, gegen Ende der Arbeit durch den Sequenzierservice Seq-IT im Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern.

Sequenzbearbeitung und -analyse

Die Sequenzen wurden mit den Programmen Chromas LITE (Version 2.01, 1998-2005, Technelysium Pty Ltd.) und DNAMAN (Version 4.0, 1994-1998, Lynnon BioSoft.) visualisiert und gegebenenfalls invertiert. Alle Sequenzen wurden per Auge durchsichtet, Lesefehler korrigiert und nicht gelesene Basen ergänzt. Ein Nukleotid- oder Protein-Alignment der verbesserten und assemblierten Sequenzen erfolgte mit der Software MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), wobei die Nukleotidsequenzen mit der Software Emboss Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>) translatiert wurden. Für die Abfrage von Genomsequenzen und die Durchführung von Blasts wurde auf die Datenbanken: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://nbc3.biologie.uni-kl.de/> und <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> zugegriffen. Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der PBP des *S. pneumoniae*-Stammes 2349 wurden von Fang Chi zur Verfügung gestellt (Chi, unveröffentlicht).

2.7.2.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

RACE ist eine Methode, welche zur Bestimmung der 5' (5'-RACE) und 3' (3'-RACE) -Enden von RNA verwendet werden kann (Argaman *et al.*, 2001; Bensing *et al.*, 1996; Frohman *et al.*, 1988; Schaefer, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die 5'-RACE zur Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes von *pbp2b* eingesetzt. Hierbei wurde nach Isolierung der Gesamt-RNA diese zunächst einer Behandlung mit dem Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) unterzogen, um von dem am 5'-Ende der messenger RNA (mRNA) liegenden Triphosphat ein Pyrophosphat abzuspalten. Dadurch wurde die mRNA als Substrat für die T4-RNA-Ligase zugänglich und die Ligation eines RNA-Oligonukleotids bekannter Sequenz an das 5'-Monophosphatende im folgenden Schritt ermöglicht. Nach einer reversen Transkription mit einem Primer, welcher innerhalb *pbp2b* lag, wurde das 5'-Ende der complementary DNA (cDNA) mit einem zum RNA-Oligonukleotid komplementären Primer und einem weiteren genspezifischen Primer in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert, wobei das erste unmittelbar auf das 3'-Ende des ligierten RNA-Oligonukleotids folgende Nukleotid den gesuchten Transkriptionsstartpunkt darstellte. Als Negativkontrolle diente in allen Reaktionen ein Ansatz mit TAP-unbehandelter RNA, welcher letztendlich kein PCR-Produkt liefern durfte, da durch die fehlende TAP-Behandlung keine Ligation mit dem RNA-Oligonukleotid stattfinden konnte.

Behandlung der RNA mit TAP

Für die 5'-RACE wurden jeweils 15 µg Gesamt-RNA in einem Ansatz mit TAP (Biozym) und in einem ohne TAP eingesetzt (Tab. 2.36), wobei zuvor eine Inkubation der RNA für 5 min bei 55 °C erfolgte. Die TAP-Behandlung wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt; parallel dazu wurde der TAP-unbehandelte Ansatz unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen jeweils 250 µl DEPC-H₂O (Ambion) zugegeben und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurden diese mit 300 µl Phenol (Aqua-Phenol)/Chloroform (1:1) versetzt, für 30 s gevortext und für 5 min bei 14 000 Upm zentrifugiert (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf). Die Oberphase wurde abgenommen, mit 30 µl Na-Acetat (3 M, pH 5) und 800 µl kaltem EtOH (100 %, p.a.) gemischt, für 10 min bei -20 °C inkubiert und schließlich für 20 min bei 15 000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28RS) (Heraeus Sepatech). Nach Abnahme des Überstands wurden die RNA-Pellets mit 200 µl EtOH (70 %, p.a.) gewaschen, für 5 min bei 15 000 Upm und 4 °C zentrifugiert und nach Entfernung des Überstands für 10 min bei 55 °C getrocknet.

Tab. 2.36: Zusammensetzung eines Ansatzes zur TAP-Behandlung von RNA.

Reaktionsansatz	Komponente	Menge
Ansatz mit TAP	TAP-Puffer (10x)	5 µl
	SUPERaseIN™ (20 U/µl) (Ambion)	2 µl
	RNA	15 µg
	TAP (10 U/µl)	2,5 µl
	DEPC-H ₂ O	ad 50 µl
Ansatz ohne TAP	TAP-Puffer (10x)	5 µl
	SUPERaseIN™ (20 U/µl) (Ambion)	2 µl
	RNA	15 µg
	DEPC-H ₂ O	ad 50 µl
Inkubation für 1 h bei 37 °C		

Ligation des RNA-Oligonukleotids

Zur Ligation des RNA-Oligonukleotids wurden die RNA-Pellets jeweils in 55 µl DEPC-H₂O (Ambion) resuspendiert und die Ansätze für 5 min bei 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl RNA-Oligonukleotid 5'RACE (siehe Tab. 2.13) erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 95 °C und anschließend für 2 min auf Eis. Schließlich wurden die restlichen Komponenten des Ligationsansatzes (Tab. 2.37) zugefügt und die Ansätze über Nacht bei 17 °C ligiert.

Bevor die Ligationsansätze in einer reversen Transkription eingesetzt wurden, erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, wie zuvor beschrieben.

Tab. 2.37: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes mit RNA-Oligonukleotid.

Komponente	Menge
RNA-Ligase-Puffer (10x)	10 µl
SUPERaseIN™ (20 U/µl) (Ambion)	4 µl
RNA-Oligonukleotid 5´RACE (100 µM)	5 µl
RNA (15 µg)	55 µl
T4-RNA-Ligase (20 U/µl)	5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 100 µl
Inkubation über Nacht bei 17 °C	

Reverse Transkription (RT)

Die RNA-Pellets wurden in 50 µl DEPC-H₂O (Ambion) aufgenommen und jeweils 8,2 µl RNA-Lösung für eine RT mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Avian Myoblastosis Virus (AMV)) (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 2 µl genspezifischer Primer pbp2b_race_1 (1 µM) (siehe Tab. 2.13) eingesetzt, welcher sich ca. 300 bp stromabwärts vom erwarteten Transkriptionsstartpunkt befand, wodurch genügend Vorlauf für die im Anschluss folgende Sequenzierung gegeben war (siehe unten).

Amplifikation der cDNA

Zur Amplifikation der synthetisierten cDNA wurden jeweils 5 µl der beiden Ansätze einer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase Red GoldStar™ (Eurogentec) unterzogen.

Tab. 2.38: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Amplifikation der cDNA.

Komponente	Menge
Puffer (10x)	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	8 µl
dNTP-Mix (10 mM) (Peqlab)	2,5 µl
RNA-Adapter spezifischer Primer RACE-PCR_5' (10 µM)	2,5 µl
genspezifischer nested Primer pbp2b_race_2 (10 µM)	2,5 µl
Template-DNA (cDNA)	5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Red GoldStar™ (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 100 µl

Dabei wurden der zum RNA-Oligonukleotid komplementäre Primer RACE-PCR_5´ und der genspezifischer Primer pbp2b_race_2 (siehe Tab. 2.13) verwendet, wobei letzterer ca. 40 bp näher

am gesuchten 5'-Ende lag als der zuvor in der reversen Transkription eingesetzte Primer pbp2b_race_1 (siehe Tab. 2.13). Der Reaktionsansatz und das Programm zur PCR sind in Tab. 2.38 und Tab. 2.39 aufgeführt.

Tab. 2.39: Zusammensetzung eines Programms zur Amplifikation der cDNA.

Schritt	Temperatur	Dauer
1 initiale Denaturierung	95 °C	10 min
2 Denaturierung	95 °C	30 s
3 Annealing	48 °C, 50 °C	40 s
4 Elongation	72 °C	40 s
5 finale Elongation	72 °C	10 min
6 Pause	10 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 39mal wiederholt.

Analyse und Sequenzierung

Zur Analyse wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes mit der TAP-behandelten und -unbehandelten Probe auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Konnte in der TAP-behandelten Probe ein PCR-Produkt identifiziert werden und lieferte die TAP-unbehandelte Probe kein Produkt, so wurde das Fragment aufgereinigt und mit dem zur Amplifikation der cDNA verwendeten genspezifischen Primer pbp2b_race_2 (siehe Tab. 2.13) sequenziert (siehe 2.7.2.6).

2.7.3 Chromosomale Modifikation von *Streptococcus pneumoniae*

2.7.3.1 Herstellung der Thr338-Punktmutanten mittels gerichteter Mutagenese durch Überhangsverlängerung

Als Mutagenesetechnik für die Einführung der Thr338-Punktmutationen in PBP2x kam die sogenannte gerichtete Mutagenese durch Überhangsverlängerung (overlap extension) mittels PCR zur Anwendung (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989). Hierbei wurden zunächst einmal in zwei separaten PCR-Ansätzen mit chromosomaler DNA von *S. pneumoniae* R6 als Template zwei pbp2x-Fragmente generiert, welche im Bereich der einzuführenden Mutation überlappen (Abb. 2.1). In den Reaktionen wurde jeweils ein äußerer Primer, welcher am 5' (pbp2x_5') oder 3' (pbp2x_3') -Ende (siehe Tab. 2.5) der Zielsequenz hybridisierte, und ein interner Primer, welcher an der Mutationsstelle hybridisierte und die entsprechenden auszutauschenden Basen trug (pbp2x_A-RM, pbp2x_A-FM, pbp2x_P-RM, pbp2x_P-FM, pbp2x_G-RM, pbp2x_G-FM) (siehe Tab. 2.5) eingesetzt. In einer dritten überlappenden PCR wurde nach Denaturierung und

Hybridisierung der beiden *pbp2x*-Fragmente im Mutationsbereich, das entstandene Hybrid von den freien 3'-Enden zum vollen Doppelstrang aufgefüllt (extension) und dieser schließlich mit den äußeren Primern (*pbp2x_5'*, *pbp2x_3'*) als mutagenisiertes Endprodukt amplifiziert (siehe 2.7.2.5). Die drei derart erzeugten mutagenisierten *pbp2x*-Fragmente hatten jeweils eine Größe von 1909 bp und enthielten entweder das Codon für den T338A-, T338P- oder T338G-Austausch. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit 3'-A-Überhängen versehen (siehe 2.7.2.3) und einer TA-Klonierung in dem Vektor pGEM[®]-T Easy in *E. coli* JM109 unterzogen (siehe 2.6.7). Die entsprechenden Mutationen in den Inserts rekombinanter Klone wurden durch doppelsträngige Sequenzierung verifiziert (siehe 2.7.2.6) und R6 mit den resultierenden Vektoren pGEM-2xT338A, pGEM-2xT338P und pGEM-2xT338G transformiert (siehe Tab. 2.4 und 2.6.6). Die Selektion der Transformanten erfolgte wie in 3.1.1.2 beschrieben.

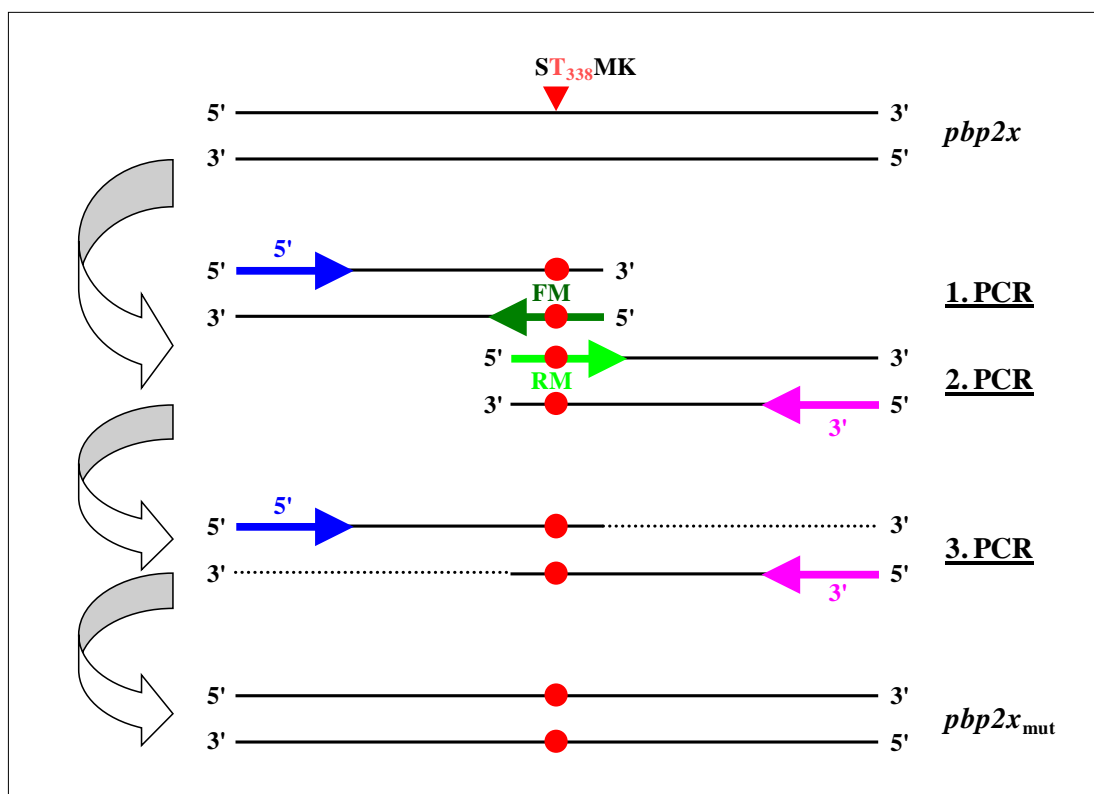


Abb. 2.1: Herstellung der Thr338-Punktmutanten mittels gerichteter Mutagenese durch Überhangsverlängerung.

Veranschaulicht ist die Vorgehensweise zur Generierung einer Punktmutation an Position Thr338 in PBP2x. In zwei PCR-Ansätzen (1. und 2. PCR) wurden zwei Primerpaare (5', FM und 3', RM) eingesetzt um zwei Fragmente des *pbp2x*-Gens zu erzeugen, welche im Bereich der einzuführenden Mutation überlappen. In einem dritten PCR-Ansatz (3. PCR) entstand durch Denaturierung und Hybridisierung der beiden Fragmente im Mutationsbereich ein Hybrid, welches von den freien 3'-Enden zum vollen Doppelstrang aufgefüllt und als mutagenisiertes Endprodukt mit den äußeren Primern (5' und 3') amplifiziert wurde. Die schwarzen Balken stehen für den 5'- bzw. 3'-Strang des *pbp2x*-Gens, blaue, grüne und pinke Pfeile kennzeichnen Primer, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt. Die Mutationsstelle ist durch einen roten Punkt markiert.

Abk.: FM (Forward Mutagenese), mut (mutagenisiert), RM (Reverse Mutagenese)

2.7.3.2 Herstellung der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}-Transformante mithilfe der Janus-Kassette

Die sogenannte Janus-Kassette vermittelt einen Kanamycin-Resistenz- und Streptomycin-Sensitivitäts-Phänotyp in einem Streptomycin-resistenten genetischen Hintergrund und erlaubt somit den Austausch von Genen durch negative Selektion unter Vermeidung von β -Laktam-Selektion (Sung *et al.*, 2001). Auf der 1363 bp großen Kassette befindet sich zum einen eine synthetisch veränderte Kanamycin-Resistenzkassette mit dem für eine 3'5''-Aminoglykosid Phosphotransferase TypIII codierenden Gen *aphIII* und zum anderen das Gen *rpsL*⁺, welches für die dominante Wildtypform des 30S-ribosomalen Proteins S12 codiert. Als Rezipient für die Einführung des 2349-*pbp1a* mithilfe der Janus-Kassette diente die R6_{pbp2xT338G}-Mutante. Zunächst wurde die Janus-Kassette in einer PCR mit chromosomaler DNA des Stammes R6_{dexS::aphIII-rpsL}⁺ und den Primern Ja-Kass_for und Ja-Kass_rev amplifiziert (siehe Abb. 2.2 und Tab. 2.5). Ebenso wurden die zur homologen Rekombination der Kassette im Genom benötigten *pbp1a*-Fragmente unter Verwendung von chromosomaler R6-DNA als Template und den Primerpaaren Ja-pbp1a_for und Ja-pbp1a-seq_rev bzw. Ja-pbp1a_rev und Ja-pbp1a-seq_for (siehe Tab. 2.5) hergestellt. Dabei waren die Primer Ja-Kass_for, Ja-Kass_rev, Ja-pbp1a-seq_rev und Ja-pbp1a-seq_for mit komplementären Anhängen versehen, sodass die drei Fragmente schließlich in einer überlappenden PCR mit den Primern Ja-pbp1a_for und Ja-pbp1a_rev zusammengefügt werden konnten (siehe 2.7.2.5). Das entstandene 3814 bp große Endprodukt umfasste 69 bzw. 222 bp der 5'- bzw. 3'-Umgebung, 1092 bzw. 1068 bp des 5'- bzw. 3'-Endes von *pbp1a*, sowie die gesamte Janus-Kassette. Zur Generierung des für ihre Anwendung erforderlichen Streptomycin-Resistenzphänotyps wurde R6_{pbp2xT338G} im Vorfeld mit einem 592 bp großen PCR-Produkt transformiert (siehe 2.6.6), das von chromosomaler DNA des Stammes *amiA9* mit den Primern *rpsL*_f und *rpsL*_r (siehe Tab. 2.5) amplifiziert wurde und eine Streptomycin-Resistenz vermittelnde Punktmutation in *rpsL* (K56T) trug. In einem ersten Schritt wurde die Streptomycin-resistente R6_{pbp2xT338GrpsLK56T}-Mutante mit dem 3820 bp großen *pbp1a*-Janus-Konstrukt transformiert (siehe 2.6.6), wobei die Selektion mit 200 μ g/ml Kanamycin erfolgte. Die dabei erhaltenen Kolonien wurden mit 200 μ g/ml Streptomycin auf ihre Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum hin überprüft, da durch die Aufnahme der Janus-Kassette und des auf ihr codierten dominanten *rpsL*⁺-Allels, Transformanten neben der Kanamycin-Resistenz auch eine Streptomycin-Sensitivität aufweisen sollten. Durch die Integration des Konstrukts zwischen Aminosäure 363 und 366 der Transpeptidase-Domäne von PBP1a besaßen diese R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL}⁺-Mutanten nun ein nichtfunktionelles PBP1a. In einem zweiten Schritt wurde eine der Mutanten einer Transformation (siehe 2.6.6) mit dem Plasmid pGEM-1aRes (siehe Tab. 2.4) unterzogen, wodurch es zur Rekombination des darin enthaltenen 2349-*pbp1a* über die mit dem R6-*pbp1a* homologen Bereiche am 5'- und 3'-Ende kommen und die Janus-Kassette entfernt werden sollte. Da nach Verlust der Kassette der ursprüngliche Kanamycin-Sensitivitäts- und Streptomycin-Resistenzphänotyp wiederhergestellt wird, wurde

mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin selektiert und die Kolonien mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin auf Kanamycin-Sensitivität getestet.

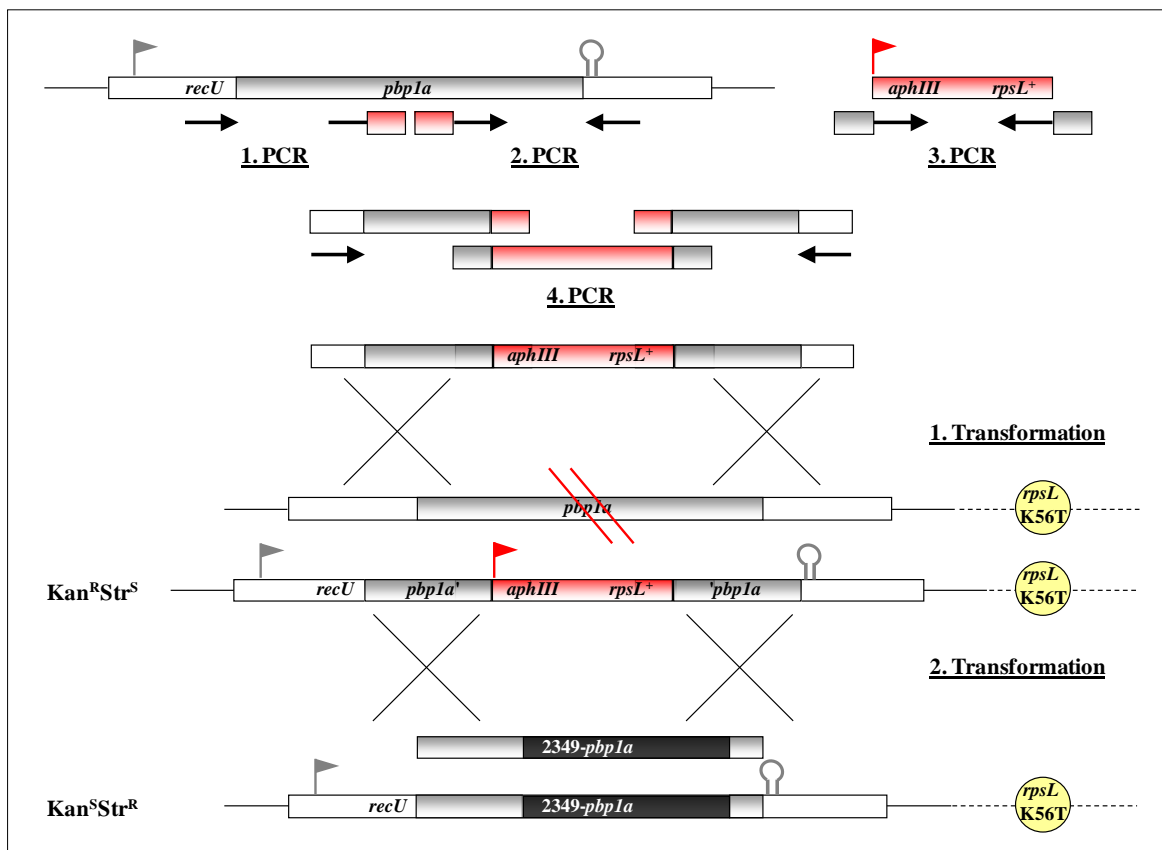


Abb. 2.2: Strategie zur Einführung des 2349-*pbp1a* in die R6_{*pbp2xT338G*}-Mutante mithilfe der Janus-Kassette.

Das Schema verdeutlicht die Vorgehensweise zur Einführung des 2349-*pbp1a* in die R6_{*pbp2xT338G*}-Mutante mittels der Janus-Kassette. In drei PCR-Ansätzen wurden die zur homologen Rekombination im Genom benötigten *S. pneumoniae* R6-*pbp1a*-Fragmente und die Janus-Kassette amplifiziert. Durch die komplementären Sequenzen am Ende der drei Produkte konnten diese in einer vierten überlappenden PCR zu einem Konstrukt zusammengeführt werden, welches die Janus-Kassette, flankiert von den beiden *pbp1a*-Fragmenten umfasste. Nach Generierung des für die Anwendung der Janus-Kassette erforderlichen Streptomycin-Resistenzphänotyps in R6_{*pbp2xT338G*} wurde die R6_{*pbp2xT338G*}*rpsL*K56T-Mutante in einem ersten Schritt mit dem *pbp1a*-Janus-Konstrukt transformiert. Die Präsenz der Janus-Kassette in dem Streptomycin-resistenten genetischen Hintergrund führte zu einer Kanamycin-Resistenz und gleichzeitigen Streptomycin-Sensitivität. Zudem verfügten die Mutanten durch die Integration der Kassette innerhalb der Transpeptidase-Domäne über ein nichtfunktionelles PBP1a. In einem zweiten Schritt kam es durch die Transformation einer solchen Kanamycin-resistenten und Streptomycin-sensitiven R6_{*pbp2xT338G*}*pbp1a::aphIII-rpsL*⁺-Mutante mit dem Plasmid pGEM-1aRes, welches ein Fragment des 2349-*pbp1a* beinhaltetete, zum Austausch der Janus-Kassette durch letzteres und zur Wiederherstellung des ursprünglichen Kanamycin-Sensitivitäts- und Streptomycin-Resistenzphänotyps. Gene sind durch Balken dargestellt (hellgrau: R6-*pbp1a*, dunkelgrau: 2349-*pbp1a*, rot: Janus-Kassette, weiß: flankierende Gene des R6-*pbp1a*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt, Rechtecke an den schwarzen Pfeilen stehen für komplementäre Anhänge, Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet. Der gelbe Kreis markiert die im Vorfeld eingeführte Streptomycin-Resistenz vermittelnde Punktmutation *rpsL* (K56T).

2.7.3.3 Herstellung von *pbp1a*-Deletionsderivaten

Zur In-frame-Deletion von *pbp1a* wurde das Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Gen *aphIII* der Resistenzkassette des Plasmids pDG782 (siehe Tab. 2.4) herangezogen, welches inklusive Shine-Dalgarno (SD) -Sequenz, aber ohne Promotor und Terminator in einer PCR mit den Primern 1a-KanR_for und 1a-KanR_rev amplifiziert wurde (siehe Abb. 2.3 und Tab. 2.5).

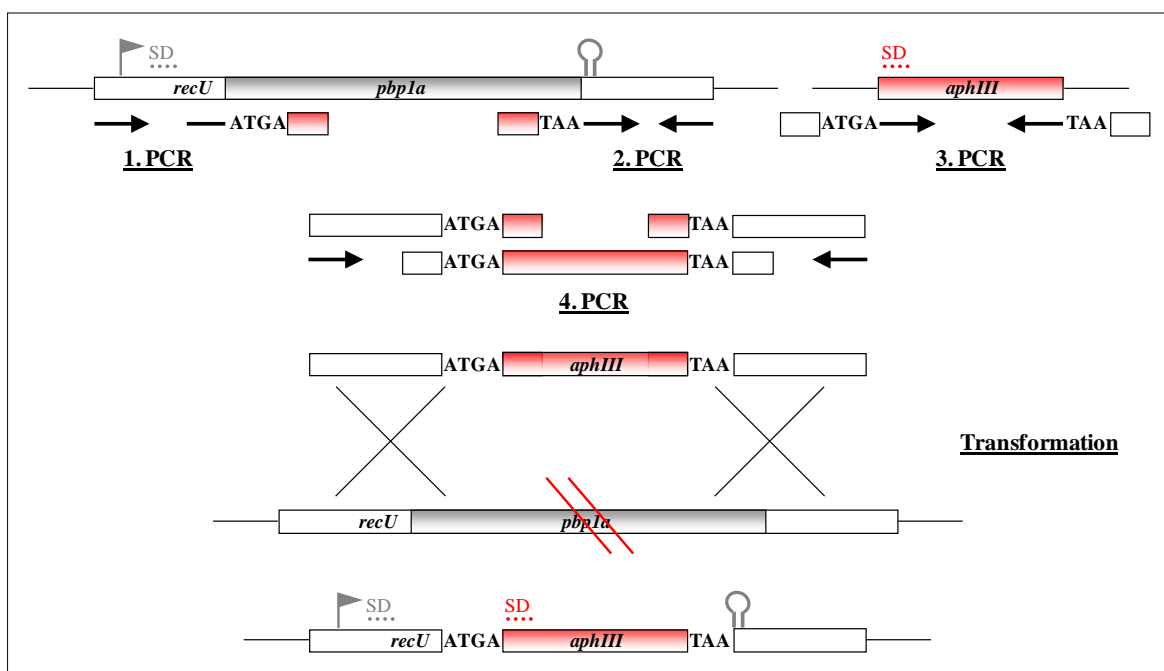


Abb. 2.3: Herstellung von *pbp1a*-Deletionsderivaten.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung zur Konstruktion von *pbp1a*-In-frame-Deletionsderivaten. Zwei PCR-Ansätze lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten Fragmente der flankierenden Bereiche von *pbp1a* einschließlich dessen Start- und Stopcodons, ein dritter das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* mit SD-Sequenz, aber ohne Transkriptionssignale. Durch die komplementären Sequenzen am Ende der drei Produkte konnten diese in einer vierten überlappenden PCR zu einem Konstrukt zusammengeführt werden, welches aus dem *aphIII*-Gen, flankiert von dem Start- und Stopcodon, sowie Teilen der Umgebung von *pbp1a* bestand. Nach der Transformation und homologen Rekombination des Konstrukts befand sich das Resistenzgen unter der Kontrolle des Promotors von *pbp1a*. Gene sind durch Balken dargestellt (hellgrau: *pbp1a*, rot: *aphIII*-Resistenzgen des Plasmids pDG782, weiß: flankierende Gene von *pbp1a*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt, Rechtecke an den schwarzen Pfeilen stehen für komplementäre Anhänge, die Basen des Start- und Stopcodons von *pbp1a* sind angegeben, Promotoren, Terminatoren und SD-Sequenzen sind durch Fahnen, Stem-Loop-Strukturen und punktierte Linien in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet.

In zwei weiteren PCR-Ansätzen mit chromosomaler R6-DNA und den Primerpaaren 1a_for und 1a-seq_rev bzw. 1a_rev und 1a-seq_for (siehe Tab. 2.5) erfolgte die Amplifikation der *pbp1a* flankierenden Bereiche einschließlich des Start- und Stopcodons, sowie des mit ersterem aufgrund der Operonstruktur von *pbp1a* und *recU* überlappenden Stopcodons von *recU*. Da die Primer 1a-KanR_for, 1a-KanR_rev, 1a-seq_rev, 1a-seq_for mit komplementären Enden versehen waren, konnten die drei Fragmente nun im Folgenden in einer überlappenden PCR mit den Primern 1a_for

und 1a_rev als 2689 bp großes Endprodukt amplifiziert werden (siehe 2.7.2.5). Dieses wurde aus 937 bzw. 928 bp der 5'- bzw. 3'-Umgebung, dem ersten und letzten Codon von *pbp1a* und einem 817 bp-Segment der insgesamt 1489 bp großen Resistenzkassette gebildet. Die Selektion der Transformanten bei der anschließenden Transformation (siehe 2.6.6) dieses Konstrukts erfolgte mit 200 µg/ml Kanamycin. In den derart konstruierten Derivaten war *pbp1a* bis auf das Start- bzw. Stopcodon komplett durch den Resistenzmarker ersetzt, wobei dieser unter der Kontrolle des *pbp1a*-Promotors stand.

2.7.3.4 Herstellung von *ciaR*-Inaktivierungsderivaten

Der Stamm R6_{*ciaR::aad9*} enthält das Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* des Plasmids pDL278 aus *Enterococcus faecalis* (LeBlanc *et al.*, 1991) in dem Gen für den RR CiaR und demnach ein nicht-funktionelles Zwei-Komponenten-System CiaRH.

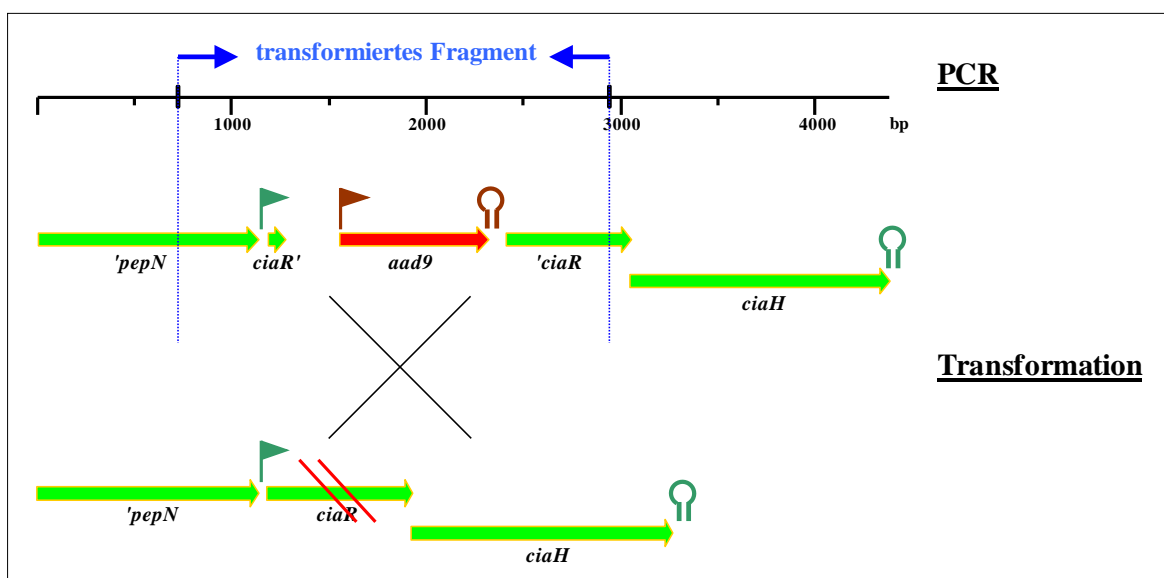


Abb. 2.4: Herstellung von *ciaR*-Inaktivierungsderivaten.

Der schematischen Darstellung ist die genetische Organisation des *ciaRH*-Operons in dem *ciaR*-Inaktivierungsderivat R6_{*ciaR::aad9*} (oberer Teil) und die Vorgehensweise zur Inaktivierung von *ciaR* in ausgewählten Stämmen (unterer Teil) zu entnehmen. Hierzu wurde ein Fragment, welches das *ciaR::aad9*-Konstrukt von R6_{*ciaR::aad9*} und Teile der 5'- bzw. 3'-Umgebung umfasste mittels PCR amplifiziert und in einer Transformation der entsprechenden Stämme eingesetzt. Durch die Integration der Spectinomycin-Resistenzkassette *aad9* kam es zur Unterbrechung von *ciaR*. Aufgrund der Operonstruktur von *ciaR* und *ciaH* wurden hierdurch beide Gene nicht mehr transkribiert und translatiert. Gene sind durch dicke Pfeile dargestellt (grün: *ciaH*, *ciaR*, *pepN*, rot: *aad9*-Resistenzgen), wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Gene wiedergibt, blaue Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer anzeigt, Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den Genen passenden Farben gekennzeichnet. Das transformierte Fragment ist durch blaue Linien hervorgehoben.

Für die Herstellung von *ciaR*-Inaktivierungsderivaten wurde ein 2225 bp großes Fragment, welches das *ciaR::aad9*-Konstrukt sowie 214 bzw. 216 bp der flankierenden Bereiche einschloss, durch PCR mit chromosomaler R6_{*ciaR::aad9*}-DNA und den Primern CiaR_for und CiaR_rev amplifiziert

(siehe Abb. 2.4 und Tab. 2.10). Die entsprechenden Stämme wurden mit diesem transformiert (siehe 2.6.6) und mit 100 µg/ml Spectinomycin selektioniert.

2.7.3.5 Herstellung von *comAB*-Inaktivierungsderivaten

Zur Herstellung des für die Inaktivierung von *comAB* eingesetzten Konstrukts erfolgte die Amplifizierung der Kanamycin-Resistenzkassette des Plasmids pDG782 (siehe Tab. 2.4) mit den Primern *aphIII_for* und *aphIII_rev* (siehe Abb. 2.5 und Tab. 2.5).

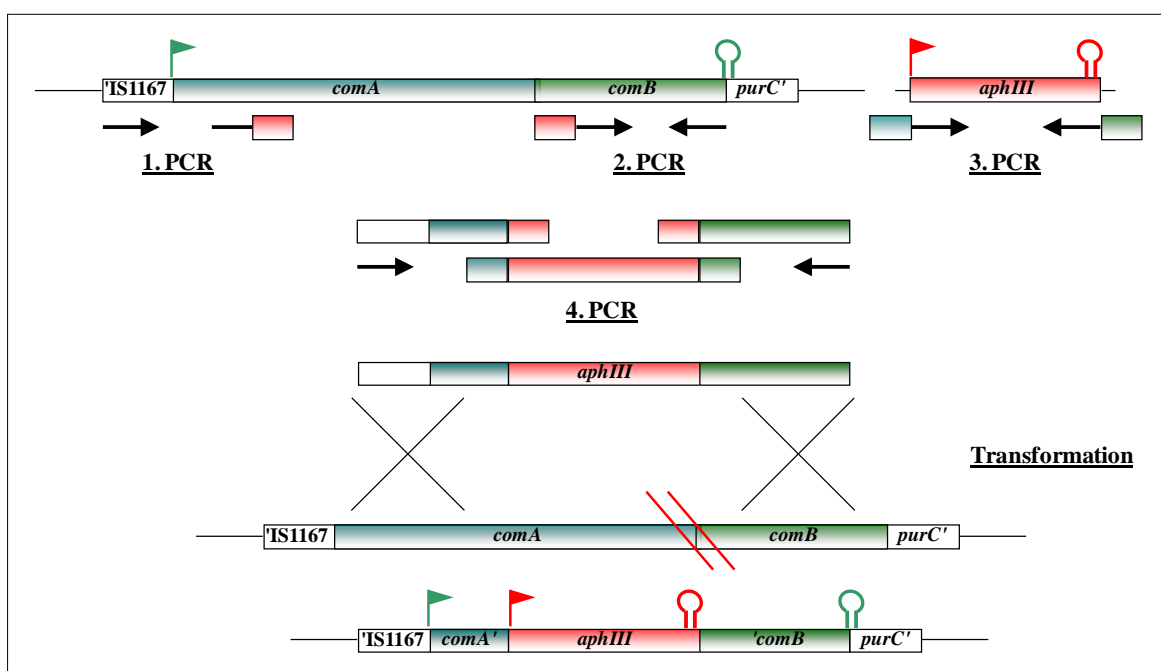


Abb. 2.5: Herstellung von *comAB*-Inaktivierungsderivaten.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung zur Konstruktion von *comAB*-Inaktivierungsderivaten. Zwei PCR-Ansätze lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten *comA* und 5'-Umgebung- bzw. *comB*-Fragmente, ein dritter das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* mit Transkriptionssignalen. Durch die komplementären Sequenzen am Ende der drei Produkte konnten diese in einer vierten überlappenden PCR zu einem Konstrukt zusammengeführt werden, welches aus dem *aphIII*-Gen flankiert von dem *comA* und 5'-Umgebung- bzw. *comB*-Fragment bestand. Es folgte die Transformation und homologe Rekombination im Genom. Gene sind durch Balken dargestellt (blau: *comA*, grün: *comB*, rot: *aphIII*-Resistenzgen des Plasmids pDG782, weiß: flankierende Gene von *comAB*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt, Rechtecke an den schwarzen Pfeilen stehen für komplementäre Anhänge, Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet.

Zwei weitere PCR-Ansätze mit chromosomaler R6-DNA als Template und den Primerpaaren *comAB_for* und *comAB-seq_rev* bzw. *comAB_rev* und *comAB-seq_for* (siehe Tab. 2.5) lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten *comA* und Umgebung- bzw. *comB*-Fragmente. Dabei wurde zur Termination der Translation von *comA* jeweils ein Stopcodon in die Sequenzen der Primer *comAB-seq_rev* und *aphIII_for* eingefügt. Durch die komplementären Linkersequenzen der Primer *aphIII_for*, *aphIII_rev*, *comAB-seq_rev* und *comAB-seq_for* konnten

die drei Fragmente letztendlich in einer überlappenden PCR mit den Primern comAB_for und comAB_rev als 3173 bp großes Endprodukt amplifiziert werden (siehe 2.7.2.5). Dieses enthielt nun 366 bp der 5'-Umgebung von *comA*, die ersten 564 bp dieses 2154 bp großen Gens, 1470 bp der insgesamt 1489 bp großen Kanamycin-Resistenzkassette und die letzten 773 bp des 1350 bp großen *comB*-Gens. Bei der Transformation (siehe 2.6.6) der entsprechenden Stämme mit dem Konstrukt wurde mit 70 µg/ml Kanamycin selektioniert, einer Konzentration, die sich in Vorversuchen für den relativ schwachen Promotor der Resistenzkassette als geeignet erwies.

2.7.3.6 Herstellung eines *pbp2b*-Inaktivierungsderivats

Bei der Herstellung des Konstrukts zur Inaktivierung von *pbp2b* wurde nach der Methode der PCR-Ligations-Mutagenese (Lau *et al.*, 2002) verfahren (Abb. 2.6).

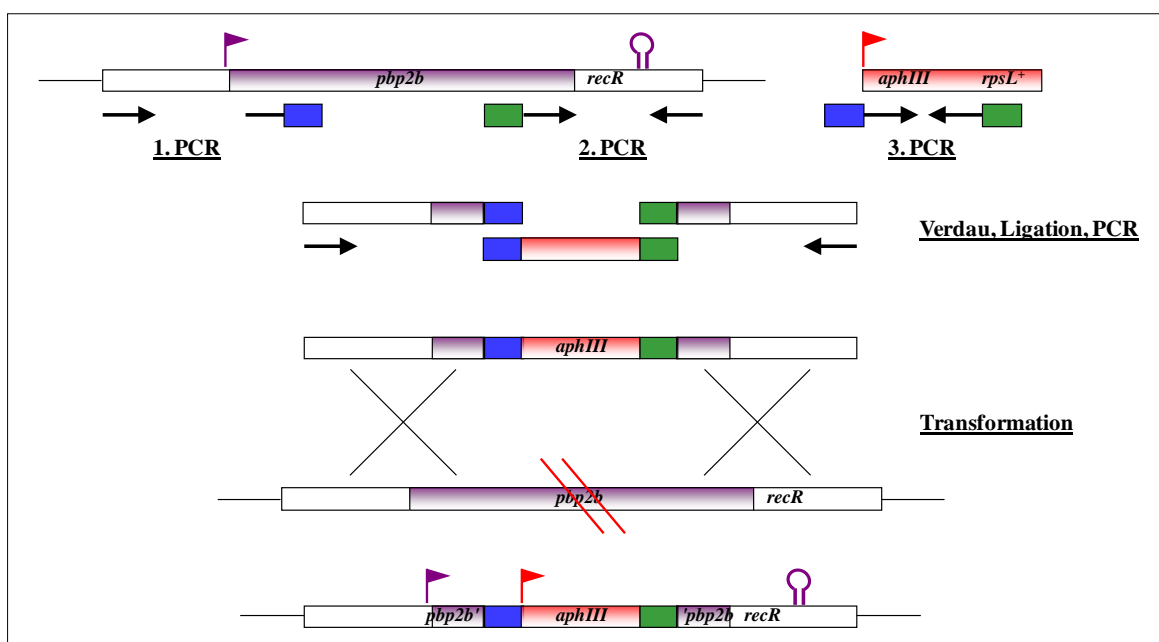


Abb. 2.6: Herstellung eines *pbp2b*-Inaktivierungsderivats.

Die Darstellung zeigt die Strategie zur Herstellung eines *pbp2b*-Inaktivierungsderivats. Zwei PCR-Ansätze lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten *pbp2b*-Fragmente, ein drittes das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* mit Promotor, aber ohne Terminator. Durch die *AscI*- und *FseI*-Schnittstellen am Ende der drei Produkte konnten diese nach Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen zu einem Konstrukt ligiert werden, welches das *aphIII*-Gen flanked von den beiden *pbp2b*-Fragmenten umfasste. Es folgten eine Anreicherung dieses Konstrukts in einer vierten PCR und seine Transformation. Gene sind durch Balken dargestellt (lila: *pbp2b*, rot: *aphIII*-Resistenzgen der Janus-Kassette, weiß: flankierende Gene von *pbp2b*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt, Rechtecke an den schwarzen Pfeilen stehen für Schnittstellen (blau: *AscI*-Schnittstelle, grün: *FseI*-Schnittstelle), Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet.

In einer PCR mit chromosomaler DNA des Stammes R6_{dexS::aphIII-rpsL⁺} und den Primern KanR_for und KanR_rev (siehe Tab. 2.5) wurde ein Fragment der Janus-Kassette (siehe 2.7.3.2) (Sung *et al.*, 2001) generiert, welches das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* und den Promotor aber nicht den

Terminator umfasste. Die zur homologen Rekombination erforderlichen *pbp2b*-Fragmente wurden mit chromosomaler R6-DNA als Template und den Primerpaaren pbp2b_P1 und pbp2b_P2 bzw. pbp2b_P4 und pbp2b_P3 (siehe Tab. 2.5) amplifiziert. Dabei waren die Primer KanR_for und pbp2b_P2 mit *AscI*-, KanR_rev und pbp2b_P3 mit *FseI*-Schnittstellen versehen, sodass nach einer Restriktion die drei PCR-Produkte über ihre kohäsiven Enden ligiert werden konnten. Die beiden Restriktionsenzyme *AscI* und *FseI* wurden deswegen ausgewählt, weil sie nur selten im Genom schneiden und der Resistenzmarker somit auf viele weitere Gen-Inaktivierungen anwendbar war. Ligiert wurde entweder in einem Ansatz mit allen drei oder in Einzelansätzen mit jeweils zwei Fragmenten (siehe 2.7.2.2). Zur Anreicherung bzw. Verknüpfung in letzterem Fall wurden die Ligationsprodukte anschließend einer PCR mit den Primern pbp2b_P1 und pbp2b_P4 unterzogen. Das daraus hervorgegangene Konstrukt mit einer Größe von 2815 bp setzte sich aus 824 bzw. 845 bp der flankierenden Bereiche, 112 bzw. 109 bp des 5'- bzw. 3'-Endes von *pbp2b* und 925 bp der insgesamt 1363 bp großen Janus-Kassette zusammen. Bei der folgenden Transformation (siehe 2.6.6) dieses Konstrukts wurde mit 50, 100 und 200 µg/ml Kanamycin selektioniert.

2.7.3.7 Herstellung eines *pbp2b*-Deletionsderivats

Für das zur In-frame-Deletion von *pbp2b* eingesetzte Konstrukt lieferte eine PCR mit chromosomaler DNA des Stammes R6_{dexS::aphIII-rpsL⁺} und den Primern KanR_for-Pro und KanR_rev-Pro (siehe Tab. 2.5) ein Fragment der Janus-Kassette (siehe 2.7.3.2) (Sung *et al.*, 2001), welches das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* ohne Transkriptions- und Translationssignale beinhaltete (Abb. 2.7). In zwei weiteren PCR-Ansätzen mit chromosomaler R6-DNA als Template und den Primerpaaren pbp2b_P1 und pbp2b_P2-Pro bzw. pbp2b_P4 und pbp2b_P3-Pro (siehe Tab. 2.5) wurden die flankierenden Bereiche inklusive des Start- und Stopcodons von *pbp2b* amplifiziert. Die komplementären Enden der Primer KanR_for-Pro, KanR_rev-Pro, pbp2b_P2-Pro und pbp2b_P3-Pro ermöglichten schließlich eine Verknüpfung der drei Fragmente in einer überlappenden PCR mit den Primern pbp2b_P1 und pbp2b_P4 (siehe 2.7.2.5). Dieses 2464 bp große Endprodukt umfasste jeweils 824 bzw. 845 bp der 5'- bzw. 3'-Umgebung, das Start- und Stopcodon von *pbp2b*, sowie ein 789 bp-Segment der 1363 bp großen Janus-Kassette. Die Selektion bei der im Anschluss durchgeführten Transformation (siehe 2.6.6) des Konstrukts erfolgte mit 50, 100 und 200 µg/ml Kanamycin. In Rekombinanten war lediglich das Start- bzw. Stopcodon von *pbp2b* vorhanden, wobei der Resistenzmarker unter der Kontrolle des *pbp2b*-Promotors stand.

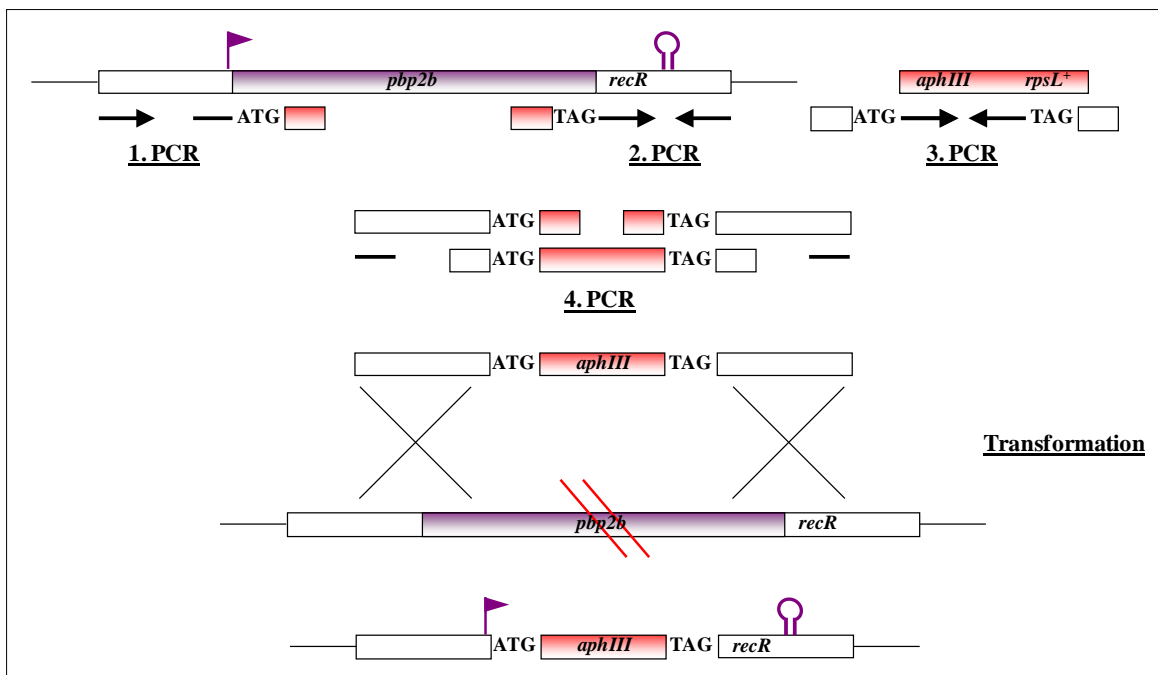


Abb. 2.7: Herstellung eines *pbp2b*-Deletionsderivats.

Der schematischen Darstellung ist die Vorgehensweise zur Konstruktion eines *pbp2b*-In-frame-Deletionsderivats zu entnehmen. Zwei PCR-Ansätze lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten Fragmente der flankierenden Bereiche von *pbp2b* einschließlich dessen Start- und Stopcodons, ein dritter das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* ohne Transkriptions- und Translations-signale. Durch die komplementären Sequenzen am Ende der drei Produkte konnten diese in einer vierten überlappenden PCR zu einem Konstrukt zusammengeführt werden, welches aus dem *aphIII*-Gen, flankiert von dem Start- und Stopcodon, sowie Teilen der Umgebung von *pbp2b* bestand. Nach der Transformation und homologen Rekombination des Konstrukts befand sich das Resistenzgen unter der Kontrolle des Promotors von *pbp2b*. Gene sind durch Balken dargestellt (lila: *pbp2b*, rot: *aphIII*-Resistenzgen der Janus-Kassette, weiß: flankierende Gene von *pbp2b*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt, Rechtecke an den schwarzen Pfeilen stehen für komplementäre Anhänge, die Basen des Start- und Stopcodons von *pbp2b* sind angegeben, Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet.

2.7.4 Microarray-gestützte Transkriptomanalyse

Ein Microarray (DNA-Chip, Gen-Chip) besteht aus Nukleinsäuremolekülen, die in rechteckiger, matrixartiger Anordnung (Array) auf einer Festphase immobilisiert sind. Diese DNA-Moleküle (Probes, Sondenmoleküle) werden mit den zu untersuchenden, radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren (Targets, Zielmolekülen) hybridisiert, wobei die Hybridisierungssignale der Targets dann detektiert, quantitativ erfasst und bioinformatisch ausgewertet werden können. Die Transkriptomanalyse stellt die wichtigste und häufigste Anwendung von DNA-Chips dar und war auch Ziel dieser Arbeit. Dabei wurde präparierte RNA unter Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide bei der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, welche dann mit synthetischen Oligonukleotiden, die als Probes dienten, auf Glasträgern (Slides) hybridisiert wurde. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe für zwei verschiedene cDNA-Populationen, die parallele Hybridisierung auf einem Array und die anschließende Detektion und den Vergleich

der Signalstärken bei unterschiedlichen Wellenlängen, konnten Differenzen im Genexpressionsmuster untersucht werden.

Die Durchführung dieser Microarray-gestützten Transkriptomanalyse beinhaltet sechs Arbeitsschritte, auf die im Folgenden näher eingegangen wird: die Herstellung der DNA-Chips, die Isolierung von Gesamt-RNA, die Herstellung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe, die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe und schließlich die Datenerfassung und -analyse.

2.7.4.1 Das *Streptococcus pneumoniae* R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set

Als Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Experimente diente ein in Kooperation mit der Firma Operon konzipiertes Oligonukleotid-Set, welches insgesamt 2963 Oligonukleotide (Oligos) umfasst (<http://www.nbz.uni-kl.de/de/bio/microarray/r6tigr4oligos.html>). Dabei decken 2347 Oligos annotierte Gene und 488 Oligos intergene Regionen (nicht-codierende Regionen) von *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 ab. Hinzu kommen 44 Oligos für repetitive Elemente, transfer RNA (tRNA)-, ribosomal RNA (rRNA)-, RNA-Gene, nicht-codierende Bereiche, das *pbp2x* von *S. pneumoniae* 2349 und 84 Oligos für diverse Kontrollen (Positiv-, Negativ-, Stringenz-, Alien- und eukaryotische Gen-Kontrollen). 163 Pufferkontrollen ohne Oligo dienen als weitere Negativkontrollen. Bei den 2347 Oligos für annotierte Gene in *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 wird zwischen vier verschiedenen Typen unterschieden: Typ 1-Oligos für identische Gene in beiden Stämmen, Typ 2-Oligos für Stamm-spezifische Gene, Typ 3-Oligos für Gene mit einer in beiden Stämmen konservierten Region und Typ 4-Oligos für Gene, die über die gesamte Länge variieren, wobei R6 der Referenzstamm ist. Bei den Oligos handelt es sich um 70mer Sense-Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Amino-C6-Linker besitzen, welcher als reaktive Gruppe zur kovalenten Bindung auf den verwendeten Epoxyglaträgern (Epoxyglides) fungiert. Die Oligos sind in jeweils 20 µl Spotpuffer Saline Sodium Citrate (SSC) (3x)/Betain (1,5 M) gelöst, sodass sie in einer Endkonzentration von 15 µM vorliegen. Sie sind auf neun Mikrotiterplatten verteilt, welche bei -20 °C versiegelt mit Adhäsionsfolie (ThinSeal™) (EXCEL Scientific Inc.) gelagert werden. Ergänzend gibt es noch eine Mikrotiterplatte mit insgesamt 90 Oligos und 32 Pufferkontrollen (Zusatzplatte). Ursprünglich wurde diese Platte für Testzwecke zum Lösungsvolumen der Oligos verwendet und enthält demnach hauptsächlich Testoligos (Oligos für alle sechs PBP-Gene, *rpsM*, *spr1094* und Stringenzkontrollen) in unterschiedlichen Konzentrationen. Zusätzlich befinden sich aber auch noch zehn Oligos für die Gene der nicht-codierenden regulatorischen *cia* controlled small RNAs 1-5 (csRNAs 1-5), welche durch das Zwei-Komponenten-System CiaRH reguliert werden, sowie für *ruvI* 1-4 und das Boxelement *aorfR* in dieser Platte, weshalb sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

2.7.4.2 Herstellung der DNA-Chips

Zur Herstellung der DNA-Chips wurde das SpotArray™²⁴ Microarray Spotting System BioChip Technologies (Packard BioScience) und die dazugehörige Software SpotArray™ (PerkinElmer) verwendet. Bei diesem Printing-System erfolgt das Aufbringen der Oligonukleotide auf die Glas-träger (Printing) durch das Kontaktverfahren, bei dem die Oligos mit speziellen Dispensiernadeln (Pins) aus den Mikrotiterplatten aufgenommen und anschließend durch mechanischen Kontakt mit der Trägeroberfläche aufgetragen werden. Die Übertragung der Oligos geschah mithilfe von einem Printkopf, der 32 Mikrospotting-Pins (SMP3-Pins) (Telchem) enthält. Zunächst einmal mußten jedoch die späteren Positionen der Oligonukleotide auf dem Slide in der SpotArray™-Software definiert werden, sodass nach dem Printvorgang jeder Spot einem Oligonukleotid zugeordnet werden konnte, eine Zuordnung, die unter einer *.gal-Datei abgespeichert wurde. Vor Beginn des Printings wurden die Slides (Nexterion® Slide E) (Schott) mit einem Diamantschreiber beschriftet, mit einer Druckluftvorrichtung von Staubpartikeln befreit und in den Arrayer eingelegt. Als Blocking-Slides, auf denen ein Abtupfen der Pins erfolgte, fungierten gewöhnliche Objektträger, die vor dem Einlegen mit Ethanol (70 %, tech.) gesäubert und mit Druckluft getrocknet wurden. Die Mikrotiterplatten mit den Oligonukleotiden wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, für 2 min bei 800 Upm abzentrifugiert (Hermle Z 513 K) (Axon) und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Der Arrayer wurde immer mit drei Mikrotiterplatten gleichzeitig be-stückt, wobei die Plattenbelegung wie folgt aussah: Platte 1, 2, 3; Platte 4, 8, 9 und Platte 5, 6, 7. Sollten die Oligonukleotide der Zusatzplatte mitgespottet werden, so wurde der Arrayer zweimal mit vier und einmal mit zwei Mikrotiterplatten gleichzeitig beladen, wobei die Plattenbelegung sich folgendermaßen zusammensetzte: Platte 1, 2, 3, 4; Platte 8, 9, 5, 6 und Platte 7, Zusatzplatte. Die Einstellungen des verwendeten Printing-Protokolls sind in Tab. 2.40 aufgeführt.

Nach Beendigung des Printings wurden die Slides für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und im Anschluss für 1 h bei 85 °C inkubiert. Durch die vorübergehende Rehydrierung und das anschließende schnelle Trocknen wird die Immobilisierung der gespotteten Oligos durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den Amino-C6-Gruppen am 5'-Ende der Oligos und den Epoxy-Gruppen auf der Slideoberfläche bewirkt. Die DNA-Chips wurden bis zur Verwendung trocken und dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Auf den derart hergestellten DNA-Chips be-fanden sich alle Oligos und Pufferkontrollen in jeweils 2facher Ausführung in der zuvor in der SpotArray™-Software festgelegten Anordnung. Dabei entsprach die Anordnung der genspezifischen Oligos nicht ihrer Abfolge im Genom von *S. pneumoniae* und auch die Kontrolloligos und Pufferkontrollen waren zufällig auf den Chips verteilt. Die DNA-Chips wurden einer optischen Kontrolle auf fehlende Spots unterzogen, wobei Chips mit zu viel fehlenden Spots nach Möglichkeit nicht verwendet wurden.

Tab. 2.40: Einstellungen des verwendeten Printing-Protokolls.

Parameter	Einstellung
1. Basic Information	
Number of plates per plate change	3
2. Barcodes	
Read barcodes on plates	No
Read barcodes on substrates	No
3. Pins	
	32
4. Preprints	
Number of preprints after each sample load	10
Preprint spot spacing center to center	390 μm
5. Array Layout	
Number of times to print each spot within array	2
Nominal spot diameter	150 μm
Spot spacing center to center	281 μm
Location of array on substrate	Center
Leave space for a barcode/label at bottom	Yes
6. Pin Motion	
Printing approach velocity	10 mm/s
Printing departure velocity	10 mm/s
Printing overtravel	0 μm
Printing dwell time	400 ms
Sample load overtravel	100 μm
Sample load dwell time	2300 ms
Substrate thickness	1,1 mm
Maximum number of spots per sample load	120
Speed of printhead X-Y motion	Fast
7. Wash and Dry	
Length of wash procedure	6 s
Number of times to wash	4

Parameter	Einstellung
Length of dry procedure after washing	3 s
8. Environmental control	
Do not print when humidity is outside of acceptable range	Yes
Minimum acceptable humidity	50 %RH
Maximum acceptable humidity	70 %RH
Control humidity level during printing procedure	Yes
Target humidity level	65 %RH
Do not print when temperature is outside of acceptable range	Yes
9. Finish	
Finish → Close	

Abk.: RH (Relative Humidity)

2.7.4.3 Herstellung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe

Um eine vergleichende Analyse der Transkriptome zweier *S. pneumoniae*-Stämme durchführen zu können, müssen die beiden RNA-Populationen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf einem Array parallel hybridisiert werden. In dieser Arbeit wurden die Stämme wie in 2.7.1.5 beschrieben, unter gleichen Bedingungen kultiviert, geerntet und die RNA isoliert. Es gab drei Arten von Replikaten zur statistischen Analyse der Transkriptomdaten: eine wiederholte Hybridisierung von cDNA auf demselben DNA-Chip (Replicate spots), eine wiederholte Hybridisierung von cDNA aus derselben Präparation (Dye-swap) und eine wiederholte Hybridisierung von cDNA aus einer weiteren Präparation (Biological replicates). Bei dem sogenannten Dye-swap wird das Experiment mit derselben cDNA wiederholt, die beiden Fluoreszenzfarbstoffe aber ausgetauscht. Dadurch werden die unterschiedlichen Eigenschaften der Farbstoffe wie Fluoreszenzintensität und Einbau bei der cDNA-Synthese berücksichtigt.

Die isolierte und aufgereinigte Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des LabelStar™ Array-Kits (50) (Qiagen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Im Zuge dieser reversen Transkription erfolgte der Einbau von fluoreszenzmarkierten Desoxycytidintriphosphaten (dCTPs) (Cy3-dCTP und Cy5-dCTP) in die entstehende cDNA. Die RNA-Lösungen aus den beiden zu vergleichenden Stämmen wurden zunächst einmal durch Einengen in einer SpeedVac (UNIVAPO 100 H) (UniEquip) auf eine Konzentration von jeweils 3 µg/µl eingestellt. Davon wurden pro Stamm zweimal 18 µl mit jeweils 2 µl Denaturierungs-Lösung (Denaturation Solution Plus) und 1 µl Random-Oktamer-Primer (100 µM) (MWG) gemischt, die Ansätze für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für weitere 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Markierung und reversen

Transkription erfolgte die Zugabe von jeweils 29 μl Mastermix, der neben Puffer, dNTP-Mix, RNase Inhibitor, Reverser Transkriptase und RNase-freiem H_2O entweder mit Cy3 oder Cy5 markierte dCTPs (PerkinElmer) enthielt. Hierbei wurde jeweils einem der beiden Ansätze eines Stammes Mastermix mit Cy3-dCTPs, dem anderen Mastermix mit Cy5-dCTPs zugegeben (Dye-swap). Da die Transkriptomanalyse jeweils mit zwei unabhängigen RNA-Präparationen eines Stammes durchgeführt wurde, lagen schließlich insgesamt acht Ansätze vor, die über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert wurden.

Die Aufreinigung der Ansätze wurde mit den im Kit enthaltenen Aufreinigungssäulen gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde die jeweilige cDNA zweimal mit 16 μl Elutionspuffer eluiert und anschließend das Volumen in einer SpeedVac vollständig eingetrocknet. Bis zur Hybridisierung wurden die Pellets bei -20 °C gelagert.

2.7.4.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Probe

Die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben erfolgte maschinell mithilfe einer Hybridisierstation (HS 400, HS 400 Pro) (Tecan) nach dem in Tab. 2.41 gezeigten Protokoll. Die markierten cDNA-Pellets wurden in jeweils 55 μl auf 95 °C erwärmten Hybridisierungspuffer aufgenommen, die Ansätze für 5 min bei 95 °C im Thermoblock (HLC) inkubiert und kurz runterzentrifugiert. Anschließend wurde jeweils eine Cy3-markierte Probe mit der zu vergleichenden Cy5-markierten Probe gemischt (Cy3-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy5-markierter cDNA von Stamm 2, sowie Cy5-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy3-markierter cDNA von Stamm 2; entsprechend die cDNA der zweiten RNA-Präparation eines jeden Stammes), für weitere 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz runterzentrifugiert. Schließlich wurden die Ansätze beim dem Schritt „Injektion der Probe“ (Tab. 2.41) auf die entsprechenden DNA-Chips appliziert.

Tab. 2.41: Einstellungen des verwendeten Hybridisierungs-Protokolls.

Schritt	Komponente	Waschdauer	Einwirkdauer	Temperatur	Zyklen
1 Waschen	SDS (0,1 %)	30 s	30 s	25 °C	1
2 Waschen	H_2O	30 s		25 °C	1
3 Waschen	Prähybridisierungspuffer	10 s	30 min	42 °C	1
4 Waschen	Prähybridisierungspuffer	20 s		40 °C	1
5 Injektion der Probe				40 °C	
6 Hybridisierung			16 h	40 °C	
7 Waschen	SSC/SDS (2x/0,1 %)	1 min	30 s	30 °C	2
8 Waschen	SSC (1x)	1 min	30 s	30 °C	2
9 Waschen	SSC (0,1 %)	1 min	30 s	30 °C	1
10 Trocknen der Objektträger			2 min	30 °C	

Nach der Hybridisierung wurden die DNA-Chips der Hybridisierstation entnommen und bis zum Einscannen, das möglichst sofort erfolgte, trocken und lichtgeschützt gelagert. Die zur Hybridisierung verwendeten Lösungen sind Tab. 2.42 zu entnehmen.

Tab. 2.42: Lösungen zur Hybridisierung.

Komponente	Konzentration
SSC (20x)	
NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
Prähybridisierungspuffer	
SSC	4x
SDS	0,1 %
BSA (sterilfiltriert)	0,1 mg/ml
SDS	0,1 %
SSC/SDS	
SSC	2x
SDS	0,1 %
SSC	1x
SSC	0,1x
Hybridisierungspuffer	
Nexterion [®] Hyb (Peqlab)	1 Vol.
Formamid	1 Vol.
bei -20 °C lagern	

2.7.4.5 Erfassung der Microarray-Daten

Nach der durchgeführten Hybridisierung konnten nunmehr vier hybridisierte Chips gescannt werden. Chip 1 lieferte den Vergleich von Cy3-markierter cDNA von Stamm 1 und Cy5-markierter cDNA von Stamm 2, Chip 2 lieferte den Vergleich von Cy5-markierter cDNA von Stamm 1 und Cy3-markierter cDNA von Stamm 2 und die restlichen zwei Chips erbrachten die entsprechenden

Vergleiche für die jeweilige zweite RNA-Präparation. Die Ergebnisse der Hybridisierung wurden als Bilddaten mit einem ScanArray[®]4000 Microarray Analysis System (PerkinElmer), gegen Ende der Arbeit mit einem ScanArray[®] G_x Microarray Scanner (PerkinElmer) erfasst. Dabei wurde ein hybridisierter Chip nacheinander von zwei Lasern verschiedener Wellenlänge abgescannt. Ein Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm diente zur Anregung der Cy3-markierten Probe, der andere mit einer Wellenlänge von 633 nm zur Anregung der Cy5-markierten Probe. Unter Verwendung der Software ScanArray[®] Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer) und der Option „EasyScan“ wurde der Chip zunächst mit einer niedrigen Auflösung von 50 µm gescannt. Dabei wurde die Photomultiplier Tube (PMT) -Stärke so eingestellt, dass beide Fluoreszenzkanäle ungefähr gleiche Signalintensitäten lieferten, schwache Spots möglichst auch erfasst und wenige gesättigte Spots erzeugt wurden. Anschließend wurde der Chip mit einer hohen Auflösung von 10 µm und den ermittelten PMT-Werten gescannt, wobei für jeden Kanal eine Bilddatei (*.tif-Datei) erhalten und gespeichert wurde.

2.7.4.6 Extraktion, Prozessierung und Analyse der Microarray-Daten

Die Extraktion, Prozessierung und Analyse der Bilddaten erfolgte mit der Software ScanArray[®] Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer), Microsoft[®] Excel 2003 (1985-2003) und diversen Anwendungen, die auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern zur Verfügung stehen. Die beiden *.tif-Dateien der Fluoreszenzkanäle wurden mit der Software ScanArray[®] Express geöffnet und das durch Überlagerung dieser Dateien von der Software erzeugte „Composite“-Bild, wenn nötig, mit Filtern (3x3 Median, Black threshold) optimiert. Die Quantifizierung, Normalisierung und Zuordnung der Spots erfolgte mit dem Quantifizierungstyp „Easy Quant“, der Quantifizierungsmethode „Adaptive circle“, der Normalisierungsmethode „Locally Weighted Scatter Plot Smoothing (LOWESS)“ (Yang *et al.*, 2001) und der Zuordnungsmethode „Auto find Spots“. Dabei wurde die beim Printing der DNA-Chips generierte *.gal-Datei (siehe 2.7.4.2), welche die Position von jedem Oligo auf dem Chip und damit die entsprechenden Gene bzw. intergenen Bereiche lieferte, geladen, und das darunter abgespeicherte Raster der aktuellen Lage der Spots auf dem Chip angepasst. Nach Zuordnung der Spots durch die Software wurden diese manuell überprüft und gegebenenfalls nachkorrigiert. Das Ergebnis, eine Tabelle, die unter anderem die Oligonamen und die entsprechenden gemessenen Intensitäten enthielt, wurde als *.csv- und *.gpr-Datei gespeichert und in Microsoft[®] Excel 2003 weiterbearbeitet. Hier wurden alle Oligos, die nicht gefunden wurden, abwesend oder von schlechter Qualität waren, herausgefiltert. Nach Überprüfung der Kontrolloligos wurden diese ebenfalls entfernt und die weitere Auswertung mithilfe der Anwendungen auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern durchgeführt. Zunächst wurden aus den Intensitätswerten der beiden Fluoreszenzkanäle mit der Normalisierungsmethode „Global Loess“ (Cleveland, 1979) durch die Anwendung „Global normalization of microarray data with loess“ die entsprechenden normalisierten Verhältnisse der

Intensitäten (Normalized ratios) berechnet. Mit der Anwendung „Werte nebeneinander schreiben“ konnten die durch die drei Arten der wiederholten Hybridisierung (Replicate spots, Dye-swap und Biological replicates) insgesamt acht erhaltenen Werte für die normalisierten Verhältnisse in einer Tabelle nebeneinander angeordnet werden. Nach Entfernen der Oligos mit nur einem Wert wurden alle Werte der Tabelle durch die Anwendung „T-test on logarithms of intensity-ratios of microarray data“ einem statistischen Signifikanztest (Hypothesentest: Zweistichproben-t-Test) unterzogen. Hierbei wurde der Mittelwert der normalisierten Verhältnisse (Average, AVG), der P-Wert (P-value) und der angepasste P-Wert (adjusted P-value) für jedes Oligo berechnet. Falls ein Gen in beiden Stämmen gleich stark exprimiert wird, müssen die Werte für die Verhältnisse der Intensitäten gleich eins sein. Der P-Wert ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass unter der Annahme, dass das Gen in beiden Proben gleich stark exprimiert ist, Werte auftreten, die weit von eins entfernt sind. Ist der P-Wert klein, so gibt es eine statistische Evidenz für einen Unterschied (irgendeiner Stärke) und man kann davon ausgehen, dass das betreffende Gen signifikant differentiell exprimiert wird. Aus dem P-Wert kann der angepasste P-Wert berechnet werden, anhand welchem die False Discovery Rate (FDR) (Benjamini und Hochberg, 1995) und die Family-Wise Error Rate (FWER) (Dudoit *et al.*, 2002), also der Anteil an falsch positiven Genen abgeschätzt werden kann. Dabei gibt die FDR das Verhältnis von falsch positiven Genen zu allen Genen auf dem Chip an und die FWER die Wahrscheinlichkeit, dass eine ausgewählte Gengruppe mindestens ein falsch positives Gen enthält. Für die Schätzung der FDR wurden die Verfahren nach Benjamini und Hochberg, 1995; Benjamini und Yekutieli, 2001 und Storey und Tibshirani, 2001 verwendet; die Berechnung der FWER erfolgte nach Bonferroni (Hochberg, 1988; Holm, 1979; Sidak, 1967). In der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Gene und intergenen Regionen als signifikant angesehen, welche einen angepassten P-Wert von $\leq 0,01$ (1 %) und eine FDR von $\leq 0,05$ (5 %) aufwiesen. Um zusätzlich die biologische Signifikanz der als signifikant differentiell exprimierten Gene und intergenen Bereiche zu gewährleisten, wurden ausschließlich Gene und intergene Regionen berücksichtigt, welche mindestens ein 2fach erhöhtes bzw. erniedrigtes Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$) zeigten. Nach Durchführung des statistischen Signifikanztests wurden die Oligos nach diesen Kriterien gefiltert und den selektierten Oligos die entsprechenden Gennamen und -informationen mithilfe der Anwendung „Locus Tag Lookup“ zugewiesen. Die derart erhaltenen signifikanten Gene und intergenen Bereiche wurden unter Verwendung der Software Artemis (Release 11, 1998-2009, The Wellcome Trust Sanger Institute), Microsoft® Access (Version 2002, 1992-2001), weiterer Anwendungen auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern, sowie durch Internetrecherche bioinformatisch aufgearbeitet und charakterisiert. Zur Kontrolle wurde ein weiteres Auswertungsverfahren hinzugezogen, dem der gleiche statistische Signifikanztest zugrunde liegt, das aber auf einer anderen Normalisierungsmethode beruht. Dazu wurde jeweils die nach Zuordnung der Spots für jeden der vier Chips eines Experiments abgespeicherte *.gpr-Datei in die Anwendung „Normalization and quality assessment“ auf

der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern eingespeist. Hierbei wird das normalisierte Verhältnis der Intensitäten für jeden der zwei Oligospots eines Chips berechnet, wobei zur Normalisierung die sogenannte „Print-tip Loess“-Methode (Yang *et al.*, 2002) verwendet wird, bei der im Gegensatz zum „Global Loess“-Verfahren die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Pins mitberücksichtigt werden. Nach Entfernen der Kontrolloligos wurden die Werte für die normalisierten Verhältnisse mithilfe der Anwendung „T-test on logarithms of intensity-ratios of microarray data“ statistisch ausgewertet und wie oben beschrieben weiter analysiert.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Untersuchung der β -Laktam-Affinität, des Laufverhaltens und der Menge von PBP wurde die SDS-PAGE verwendet, eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen. Als Trägermaterial dient hierbei Polyacrylamid, dessen dreidimensionales Netzwerk durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids (AA) und des quervernetzenden bifunktionellen N,N'-Methylenbisacrylamids aufgebaut wird. Dabei wird die Porengröße des Gels und damit die Stärke des Molekularsiebeffekts durch das Verhältnis der Konzentrationen von Acrylamidmonomer und Quervernetzungsreagenz bestimmt. Die Polymerisation wird durch Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten denaturierenden diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proteine bei der Probenvorbereitung durch Hitze und Zugabe von SDS denaturiert und solubilisiert. Durch die Anlagerung dieses anionischen Detergens an die denaturierten Proteine wird deren Eigenladung überdeckt, sodass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Zusätzlich bewirkt die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie β -Mercaptoethanol die Spaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen. Dadurch beeinflussen Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur sowie die Ladung der Proteine nicht mehr ihre elektrophoretische Beweglichkeit und die Trennung erfolgt ausschließlich nach dem Molekulargewicht der Proteine und der Porengröße des Gels in Richtung Anode. Im diskontinuierlichen System kommt es vor der eigentlichen Auftrennung der Proteine im Trenngel (Untergel) zunächst zu einer Aufkonzentrierung der Proteine („Stacking-Effekt“) im Sammelgel (Obergel). Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf vier Parameter: Gelstruktur (Porigkeit), pH-Wert und Ionenstärke der Gelpuffer, sowie Art der Ionen im Gel- und Elektrophoresepuffer und wird durch die Verwendung von unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen und Puffern für Sammel- und Trenngel, sowie zwei verschiedenen Puffersystemen für Gel und Elektrophorese erreicht.

2.8.1.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Zur Auftrennung der PBP wurden 5 %ige Sammelgele mit einem AA:Bisacrylamid (BAA)-Verhältnis von 30:0,8 verwendet. Die Prozentigkeit und das AA:BAA-Verhältnis des Trenngels richtete sich nach dem erwünschten Auftrennungseffekt. Für eine bessere Auftrennung der PBP1-Gruppe wurden 10 oder 11 %ige Gele mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8 eingesetzt, eine bessere Auftrennung der PBP2-Gruppe wurde mit 7,5 %igen Gelen mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:1,1 erzielt. Für die Herstellung des Polyacrylamidgels (11 x 8 x 0,12 cm) wurden zunächst alle benötigten Utensilien gründlich mit H₂O und Ethanol (70 %, tech.) gereinigt. Zwei Glasplatten wurden, durch zwei 1,2 mm-Abstandhalter am linken und rechten Rand getrennt, aufeinandergelegt und mit Klammern fixiert. Zum Abdichten wurde das Glasplattensandwich senkrecht in einen zuvor mit flüssiger 1,5 %iger Agarose gefüllten Proteingelfuß gestellt. Nach Erhärten der Agarose wurde die Trenngelmischung bis ca. 5 mm unterhalb der Stelle, an der später der Kamm für die Aussparung der Probenaschen enden sollte, zwischen die Glasplatten gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Grenzfläche während der Polymerisation wurde das Trenngel nach dem Gießen sofort mit H₂O ca. 2 mm überschichtet. Nachdem das Trenngel nach ca. 1-2 h auspolymerisiert war, konnte das über der Grenzschicht stehende H₂O abgegossen und Flüssigkeitsreste mit einem Stück Whatman-Filterpapier entfernt werden. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel gegossen und ein 1,2 mm-Kamm mit 16 oder 25 Zähnen möglichst zügig und luftblasenfrei von oben zwischen die Glasplatten gesteckt. Wenn nötig, wurde noch Sammelgelmischung an den Rändern nachpipettiert, damit Freiräume vollständig ausgefüllt waren. Nachdem das Sammelgel nach ca. 1-2 h vollständig auspolymerisiert war, wurde das Glasplattensandwich vorsichtig aus dem Proteingelfuß gehoben, sodass die Agaroseschicht zum Abdichten am unteren Rand möglichst erhalten blieb. Nach Entfernen der Klammern zum Fixieren wurde das Sandwich entweder in feuchte Tücher zur Lagerung bei 4 °C eingepackt oder aber direkt zur Elektrophorese eingesetzt. Die Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels zeigt Tab. 2.43.

Tab. 2.43: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels.

Gel	Komponente	Menge
Trenngel (Untergel) (7,5 %)	H ₂ O	7 ml
	AA (30 %) Rotiphorese® Gel A	5 ml
	BAA (2 %) Rotiphorese® Gel B	2,75 ml
	Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	5 ml
	SDS (10 %)	200 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl

Gel	Komponente	Menge
Trenngel (Untergel) (10 %)	H ₂ O	8,1 ml
	AA/BAA (30:0,8) Rotiphorese® Gel 30	6,7 ml
	Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	5 ml
	SDS (10 %)	200 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
Trenngel (Untergel) (11 %)	H ₂ O	3,64 ml
	AA/BAA (30:0,8) Rotiphorese® Gel 30	3,66 ml
	Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml
	SDS (10 %)	100 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
Sammelgel (Obergel) (5 %)	H ₂ O	5,7 ml
	AA/BAA (30:0,8) Rotiphorese® Gel 30	1,7 ml
	Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	2,5 ml
	SDS (10 %)	100 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl

APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen des Gels zugeben

2.8.1.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben für die SDS-PAGE wurden 10 ml C-Medium mit 0,5 ml einer Vor-
kultur von *S. pneumoniae* beimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer Nephelo von 80
wurde die Kultur für 10 min bei 7000 Upm abzentrifugiert (Biofuge® Stratos) (Heraeus
Instruments) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Na-Phosphat-Puffer (20 mM,
pH 7,2) so resuspendiert, dass 5 µl Suspension 1 ml Kultur mit einer Nephelo von 20 entsprachen
(= Standardprobe für ein Polyacrylamidgel mit 1,2 mm breiten und 5 mm langen Taschen). Die
resuspendierten Zellen wurden in 5 µl-Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Zur Lyse
der Zellen wurde Triton X-100 verwendet; die Markierung der PBP erfolgte mit Bocillin™ FL,
einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat (Zhao *et al.*, 1999). Hierzu wurden 5 µl Standardprobe
mit Na-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 7,2)/Triton X-100 (Endkonzentration: 0,2 % (v/v)) und
Bocillin™ FL (Endkonzentration: 0,01-8,3 µM) (Invitrogen) auf Eis gemischt, sodass das Gesamt-

volumen 12 μl betrug. Es folgte eine Inkubation der Probe für 2-3 bzw. 30 min im 37 °C-Wasserbad oder für 2 min bei 20 bzw. 30 °C in einem Thermomixer (Thermomixer compact) (Eppendorf). Anschließend wurde die Probe mit 12 μl Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt und für 2 min bei 95 °C in einem Thermomixer inkubiert. Zur Sedimentation von Zellfragmenten erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 2 min bei 16 000 Upm (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf). Der Überstand wurde schließlich auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Visualisierung von geringen Unterschieden in der β -Laktam-Affinität von PBP wurden zunächst einmal anhand von Kinetikstudien mit verschiedenen Temperaturen (Eis, 4, 10, 15, 21, 25, 30 und 37 °C) und Inkubationszeiten (0,5, 1, 2, 4, 8 und 16 min) für die Markierung mit Bocillin die optimalen Bedingungen ermittelt. Dazu wurden für jede zu testende Temperatur 25 μl bzw. 30 μl Standardprobe mit dem gleichen Volumen an Na-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 7,2)/Triton X-100 (Endkonzentration: 0,2 % (v/v)) gemischt und für 30 min im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und nacheinander abgearbeitet. Eine Probe wurde für 1 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, 4 μl BocillinTM FL (1 μM) zugegeben (= Zeitpunkt 0, Startpunkt der Reaktion), nach verschiedenen Zeitpunkten jeweils 5-10 μl Probe entnommen und mit 10 μl Laemmli-Probenpuffer (2x) gemischt. Nach einer Inkubation für 2 min bei 95 °C im Thermomixer wurden die Proben kurz auf Eis gestellt. Nachdem alle Proben abgearbeitet waren, wurden diese erneut für 1 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert, für 2 min bei 16 000 Upm abzentrifugiert und der Überstand jeweils auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die zur Herstellung der Proben eingesetzten Lösungen sind in Tab. 2.44 aufgezeigt.

2.8.1.3 Elektrophorese

Zur Elektrophorese wurde das wie in 2.8.1.1 beschrieben hergestellte Glasplattensandwich mit dem Polyacrylamidgel in eine vertikale Elektrophoreseapparatur mit zwei Kammern eingespannt (Apparatur Eigenbau „Berlin“) und die untere Kammer bis zu Hälfte, die obere Kammer bis ca. 1 cm oberhalb der Probentaschen mit Laemmli-Laufpuffer (1x) gefüllt. Wenn nötig, wurden Luftblasen am unteren Ende des Gels mit einer Spritze mit gebogener Kanüle herausgedrückt. Nach Entfernen des Kammes und Ausrichten der Probentaschen wurden die Proben mit einer 50 μl -Spritze (Microliter Syringe) (Hamilton) aufgetragen, wobei diese sorgfältig zwischen den einzelnen Probenauftragungen mit Laufpuffer gespült wurde. Dabei wurden nicht benötigte Taschen mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer (2x) beladen, um Verzerrungen während der Elektrophorese zu vermeiden. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3 h bei 35 mA oder 200 V, bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte oder fast aus dem Gel herauslief.

2.8.1.4 Detektion der Penicillin-Bindeproteine

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel aus dem Glasplattensandwich gelöst, das Sammelgel entfernt und die mit BocillinTM FL (Invitrogen) markierten PBP im Trenngel mithilfe eines Fluorimagers (FluorImagerTM 595) und der Software Scanner Control (Version 1996) und ImageQuant[®] (Version 5.2, 1999) (Molecular Dynamics) visualisiert und dokumentiert. Anschließend wurde das Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen, um das Laufverhalten der Proteine und die Proteinmenge in den Zelllysaten zu überprüfen. Coomassie-Brilliantblau ist ein anionischer Farbstoff, der in saurem Milieu unter Bildung eines blauen Protein-Farbstoff-Komplexes unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Während der Färbung erfolgte gleichzeitig eine Fixierung der Proteine durch Säuredenaturierung. Das saure Milieu war durch die Anwesenheit von Essigsäure in der Färbelösung gegeben. Das Polyacrylamidgel wurde zunächst für mindestens 1-2 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt (GFL-3015) (GFL) bis die Proteinbanden ausreichend sichtbar waren. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Gel zur Entfärbung über Nacht bei Raumtemperatur in Entfärbelösung 1 geschwenkt. Schließlich wurde die Entfärbelösung 1 abgegossen und das Gel bis zum gewünschten Entfärbungsgrad des Hintergrundes in Entfärbelösung 2 entfärbt. Dabei waren mehrfache Färb- und Entfärbeschritte möglich und das Polyacrylamidgel konnte in Entfärbelösung 2 für eine längere Zeit aufbewahrt werden. Die Dokumentation und Auswertung des gefärbten Gels erfolgte mit einem Flachbettscanner (Epson Perfection 4990 PHOTO) (Epson) und der Software Adobe[®]Photoshop[®]Elements (Version 2.02, 1990-2002). Die für die SDS-PAGE verwendeten Lösungen sind in Tab. 2.44 aufgeführt.

Tab. 2.44: Lösungen zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Komponente	Menge/Konzentration
Na-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)	
NaH ₂ PO ₄ (1 M)	42,3 ml
Na ₂ HPO ₄ (1 M)	57,7 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,2 mit HCl einstellen, autoklavieren, vor Gebrauch auf 20 mM verdünnen und Triton X-100 zugeben (Endkonzentration: 0,2 % (v/v))	
BocillinTM FL	0,01-8,3 µM
bei -20 °C lagern	
Laemmli-Probenpuffer (2x)	
H ₂ O	1,875 ml

Komponente	Menge/Konzentration
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	1,875 ml
Glycerin (50 %) (v/v)	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
β -Mercaptoethanol	0,75 ml
bei - 20 °C lagern	
Laemmli-Laufpuffer (5x)	
Tris	15 mg
Glycin	72 g
SDS	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
vor Gebrauch 1:5 verdünnen	
Coomassie-Färbelösung	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
über Nacht rühren, dann filtrieren	
Entfärber 1	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
Entfärber 2	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
beide Entfärber dunkel lagern	

2.8.2 Western-Blotting

Das Western- oder Immunblotting (Burnette, 1981; Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979) bezeichnet den Transfer (Blotting) von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran, auf der sie anschließend mittels Immundetektion nachgewiesen werden können. Diese Methode dient unter anderem zum Nachweis und zur quantitativen Analyse von Proteinen. Die Übertragung der Proteine auf den Träger kann dabei durch Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese (Elektroblotting) erfolgen. In dieser Arbeit kamen für die gelelektrophoretische Auftrennung und den anschließenden Transfer der Proteine auf die Membran die Methoden der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-PAGE und des Elektroblottings zur Anwendung. Hierbei wird nach Abschluss der Gelelektrophorese ein senkrecht zum Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wobei der negativ geladene Protein-SDS-Komplex von der Kathode zur Anode wandert. Auf dem Weg dorthin befindet sich eine Polymermembran (Blotmembran), auf deren Oberfläche die Proteine aufgrund meist hydrophober Wechselwirkungen immobilisiert werden. Dabei bleibt das Trennmuster des Gels auf der Membran erhalten; die Proteine sind nun aber für nachfolgende Nachweisreaktionen zugänglich. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion der Proteine über eine Antigen-Antikörperreaktion (Antikörper-Overlay), welche durch eine enzymatische Farbreaktion visualisiert wurde. Hierzu müssen nach Transfer der Proteine auf die Membran, zunächst noch verbliebene freie Bindestellen der Membran abgesättigt werden (Blocking), um eine unspezifische Adsorption durch Antikörper zu verhindern. Anschließend wird die Membran mit einer Verdünnung des Primär-Antikörpers behandelt, der spezifisch gegen das nachzuweisende Protein auf der Membran gerichtet ist und daran bindet. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper durch Waschschriffe wird die Membran mit einer Verdünnung des Sekundär-Antikörpers inkubiert, der an konstante Bereiche des Primär-Antikörpers bindet und an ein Enzym (hier: Alkalische Phosphatase (AP)) konjugiert ist. Nach weiteren Waschschriffen können die Proteine schließlich durch die Zugabe eines artifiziellen Substrates (hier: 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)) und 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) (Blake *et al.*, 1984), welches durch das Enzym zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird (hier: blauviolett Produkt) und am Ort seiner Entstehung ausfällt, an ihrer jeweiligen Position auf der Membran detektiert werden.

2.8.2.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 5 %ige Sammel- und 11 %ige Trenngele mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8 eingesetzt, wobei zur Herstellung des Polyacrylamidgels (83 x 73 x 1 mm) eine Minigel-Apparatur (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell) (Bio-Rad Laboratories) verwendet wurde. Das Gießen des Gels erfolgte gemäß den Herstellerangaben und wie in 2.8.1.1 beschrieben, wobei ein 1 mm-Kamm mit 15 Zähnen für die Aussparung der Proben-

taschen genutzt und die Mengen für die Trenn- und Sammelgelmischung der Gelgröße angepasst wurden. Die Gele benötigten jeweils 1 h zum Auspolymerisieren. Die Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels zum Western-Blotting ist Tab. 2.45 zu entnehmen.

Tab. 2.45: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels.

Gel	Komponente	Menge
Trenngel (Untergel) (11 %)	H ₂ O	1,82 ml
	AA/BAA (30:0,8) Rotiphorese® Gel 30	1,83 ml
	Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	1,25 ml
	SDS (10 %)	50 µl
	APS (10 %)	25 µl
	TEMED	2,5 µl
Sammelgel (Obergel) (5 %)	H ₂ O	1,78 ml
	AA/BAA (30:0,8) Rotiphorese® Gel 30	0,53 ml
	Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	0,78 ml
	SDS (10 %)	31,25 µl
	APS (10 %)	15,63 µl
	TEMED	1,56 µl

APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen des Gels zugeben

2.8.2.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben wurden 5 µl Standardprobe mit 3 µl Na-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 7,2)/Triton X-100 (Endkonzentration: 0,2 % (v/v)) auf Eis oder bei Raumtemperatur gemischt und der Ansatz für 10 min im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 8 µl Laemmli-Probenpuffer (2x), einer Inkubation für 2 min bei 95 °C im Thermomixer (Thermomixer compact) (Eppendorf) und einer Zentrifugation für 2 min bei 16 000 Upm (Centrifuge 5415 D) (Eppendorf), wurde der Überstand auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.8.2.3 Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte in der dafür vorgesehenen Elektrophoreseapparatur (Mini-PROTEAN® 3 Cell) (Bio-Rad Laboratories), wobei die Gelkassette mit dem Polyacrylamidgel entsprechend den Angaben des Herstellers eingespannt, die Proben wie in 2.8.1.3 beschrieben aufgetragen und die Apparatur vollständig mit Laemmli-Laufpuffer (1x) gefüllt wurde. Zur Laufkontrolle während der Elektrophorese, Blottingkontrolle und zur einfachen Identifizierung der Proteine nach der Immun-

färbung wurden zusätzlich 5 µl eines vorgefärbten Molekulargewichtstandards (peqGOLD Protein-Marker IV Prestained) (Peqlab) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für ca. 1 h bei 185 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte oder fast aus dem Gel herauslief.

2.8.2.4 Blotting

Das Elektroblothing der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde nach dem Wet- oder Tankblothing-Verfahren (Bittner *et al.*, 1980), eingetaucht in Puffer, in einer Wet (Tank)-Blotapparatur (Mini Trans-Blot[®] Cell) (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran (Hybond-LFP) (Amersham Biosciences) und zwei Stücke Whatman-Filterpapier (6 MM) auf etwas mehr als die entsprechende Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung der Proteinbindestellen für einige Minuten in MeOH (100 %, p.A.) geschwenkt, mit H₂O gespült und schließlich in Blotpuffer bis zur Verwendung belassen. Der Wet-Blot wurde möglichst zügig und luftblasenfrei zusammengebaut, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Komponenten immer mit Blotpuffer befeuchtet waren und dass die Membran, das Whatman-Filterpapier und das Gel nur mit Handschuhen ohne Talkum berührt wurden. Auf das später zur Kathode orientierte Kunststoffgitter des Blotapparetureinsatzes wurden nacheinander ein in Blotpuffer getränktes Schwammtuch, Filterpapier, das Trenngel nach erfolgter Elektrophorese, die PVDF-Membran und ein weiteres in Blotpuffer getränktes Filterpapier und Schwammtuch gelegt. Schließlich wurde das Sandwich zusammengepresst und mit dem später zur Anode orientierten Kunststoffgitter fixiert. Das Sandwich wurde in der richtigen Orientierung (sodass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode zeigte) in die Blotapparatur eingespannt, ein vertikaler Kühleinsatz mit Eis hineingestellt und die beiden Blotapparaturkammern so mit Blotpuffer gefüllt, dass das Sandwich gerade bedeckt war. Nach Verschließen der Blotapparatur erfolgte das Blotting für ca. 1 h bei 100 V und Raumtemperatur.

2.8.2.5 Immundetektion

Nach Beendigung des Blottings wurde das Sandwich auseinandergebaut und die PVDF-Membran zum Blocking mit dem nichtionischen Detergens Tween[®] 20 für 30 min bei Raumtemperatur in einer Inkubationsschale mit Phosphate-Buffered Saline Tween (PBST) geschwenkt (Rocky[®]) (Fröbel Labortechnik). Anschließend wurde der Blockingpuffer entfernt und die Membran in der Primär-Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Als Primär-Antikörper diente entweder ein affinitätsgereinigter polyklonaler PBP2x-Antikörper (anti-PBP2x rabbit) (1:10 000 in PBST) (Maurer *et al.*, 2008) zum Nachweis von PBP2x oder ein polyklonales Antiserum gegen PBP1a (anti-PBP1a 1220 K-S rabbit) (1:3000 in PBST) (Hakenbeck *et al.*, 1991) zum Nachweis von PBP1a. Nach Entfernung der Erst-Antikörperlösung wurde die PVDF-Membran zweimal für jeweils 2 min mit PBST gewaschen und schließlich in der Sekundär-Antikörperlösung für 1 h bei

Raumtemperatur geschwenkt. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um ein alkalisches Phosphatase-Konjugat, welches gegen das Kaninchen-Immunglobulin IgG gerichtet war (goat-anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated) (1:30 000 in PBST).

Tab. 2.46: Lösungen zum Western-Blotting.

Komponente	Menge
Blotpuffer	
Tris	1,51 g
Glycin	7,21 g
H ₂ O	ad 1000 ml
PBS (20x)	
NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄	28,8 g
KH ₂ PO ₄	4 g
H ₂ O	ad 1000 ml
autoklavieren, vor Gebrauch 1:20 verdünnen	
PBST	
PBS (20x)	50 ml
Tween [®] 20	0,5 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
bei 4 °C lagern	
Blotsubstratpuffer	
Tris (1 M)	100 ml
NaCl (1 M)	100 ml
MgCl ₂ (0,5 M)	10 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 9,5 mit HCl einstellen, autoklavieren	
Blotfärbelösung	
Blotsubstratpuffer (auf 37 °C vorgewärmt)	10 ml
BCIP/NBT (Roche)	60 µl
dunkel lagern	

Nach Abgießen der Zweit-Antikörperlösung folgten vier Waschschriffe, bei denen die Membran für 2 min in Phosphate-Buffered Saline (PBS) (1x), zweimal für 5 min in PBST und wiederum für 2 min in PBS (1x) geschwenkt wurde. Zur anschließenden Entwicklung des Blots wurde die Membran in eine saubere Inkubationsschale überführt, mit auf 37 °C vorgewärmten Blotsubstratpuffer überschichtet und dieser schließlich durch frisch angesetzte ebenfalls auf 37 °C vorgewärmte Blotfärbelösung ersetzt. In dieser Lösung wurde die PVDF-Membran bis zur gewünschten Intensität der Banden bei Raumtemperatur im Dunkeln geschwenkt, wobei die Banden in der Regel nach ca. 3-15 min sichtbar waren. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Visualisierungslösung entfernt und die Membran für 2 min mit H₂O gewaschen. Die Membran wurde möglichst bald nach Blotentwicklung mithilfe eines Laser-Scanner (Flachbettscanner) und der Software Adobe®Photoshop®Elements (Version 2.02, 1990-2002) dokumentiert, zwischen Whatman-Filterpapier getrocknet und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Lösungen für das Blotting und die Immundetektion sind in Tab. 2.46 aufgelistet.

2.8.3 Präparation und Analyse von Pneumokokken-Zellwand

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen der mit der β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* einhergehenden Modifizierung der PBP auf die Zellwandbiosynthese und -struktur wurde die Zellwand ausgewählter Pneumokokken-Stämme präpariert und analysiert. Die Methoden für die Isolierung der Zellwand und des Mureins aus Pneumokokken, sowie für die anschließende quantitative Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) wurden von A. Tomasz und Mitarbeitern entwickelt (García-Bustos *et al.*, 1988; Severin *et al.*, 1996; Severin und Tomasz, 1996).

Die Pneumokokken-Zellwand besteht aus Murein (Peptidoglykan) und daran kovalent gebundenen WTAs. Zunächst wird durch Kochen der Bakterienzellen in SDS die Zellmembran und ein großer Anteil der Proteine in der Membran in Lösung gebracht. Die unlösliche Zellwand wird durch Zentrifugation gewonnen und durch wiederholte Zentrifugations- und Resuspensions-Schritte von SDS befreit. Anschließend wird die Zellwand durch Glasperlen mechanisch aufgeschlossen und DNA, RNA und gebundene Proteine durch DNase-, RNase und Protease-Verdau entfernt. Es folgen weitere Reinigungsschritte, bei denen jeweils eine Extraktion mit heißem SDS, LiCl, EDTA und Aceton durchgeführt wird. Die Zusammensetzung der derart erhaltenen Zellwand kann auf drei verschiedene Arten analysiert werden. Durch Verdau mit dem Pneumokokken-Hauptautolysin N-Acetylmuramyl-L-alanin-amidase LytA werden die Stammpeptide freigesetzt, wodurch der Vernetzungsgrad und der Anteil an verzweigten Peptiden in der Zellwand bestimmt werden kann. Alternativ kann die Zellwand mit der Muramidase Mutanolysin oder Cellosyl verdaut werden, wodurch Muropeptide (Disaccharid-Peptid-Untereinheiten) mit WTAs analysiert werden können. Zudem kann das Murein über eine Hydrolyse von Phosphomono- und diester-Bindungen durch

Fluorwasserstoffsäure von den WTAs, die dabei in Lösung gehen, isoliert und mit Mutanolysin oder Cellosyl verdaut werden, was in Muropeptiden ohne WTAs resultiert (Vollmer, 2007a).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung wurden die letzten beiden Methoden zur Analyse eingesetzt. Nach Freisetzung durch Mutanolysin lagen die Muropeptide mit den reduzierenden Zuckern in zwei verschiedenen anomeren Formen vor, welche während der anschließenden HPLC-Analyse mit unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren und das Peakmuster komplizieren würden. Aus diesem Grund wurden die freigesetzten Muropeptide zunächst einmal mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Zuckeralkoholen reduziert. Die Trennung der Muropeptide erfolgte mittels Umkehrphasen (reversed phase) -HPLC auf einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule (ODS-Hypersil) (Füllmaterial-Partikelgröße: 4,6 x 250 mm, 3 µm) (Bischoff Chromatography) bei einer Temperatur von 52 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Dabei wurde die Trennsäule für 60 min mit Natriumphosphat (100 mM) und MeOH (10 %), versetzt mit Natriumazid (25 µl/l) equilibriert und 20-100 µl Probe injiziert. Die Trennung wurde zunächst für 5 min unter isokratischen Bedingungen mit Equilibrierungspuffer und anschließend für 2 ½ h in einem linearen Gradienten von drei verschiedenen Lösungsmitteln (Equilibrierungspuffer, Natriumphosphat (100 mM), MeOH (30 %)) durchgeführt. Die Detektion der eluierten Muropeptide erfolgte über die Messung der UV-Absorption der Peptidbindung bei 205 nm. Durch Vergleich der Retentionszeiten und -intensitäten der derart erhaltenen Signale mit denen aus Chromatogrammen von Stämmen mit bekannter Muropeptid-Zusammensetzung und bereits identifizierten Muropeptiden (*S. pneumoniae* R6) konnte den Signalen Strukturen zugeordnet werden. Für die Signale unbekannter Substanzen wurden anhand deren Aminosäure-/Aminosäure-Zucker-Zusammensetzung und Molekulargewichts Strukturen vorhergesagt. Hierzu wurden unbekannte Fraktionen gesammelt, in einer SpeedVac getrocknet und die Aminosäure-/Aminosäure-Zucker-Zusammensetzung analysiert bzw. das Molekulargewicht mittels Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz (Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance, FT-ICR) -Massenspektrometrie in einem LTQ-FT-Massenspektrometer bestimmt.

2.8.3.1 Herstellung der Zellysate zur Isolierung der Zellwand

Zur Herstellung der Zellysate für die Isolierung der Zellwand wurden 1 l auf 37 °C vorgewärmtes C-Medium, bei Bedarf mit Cholinchlorid versetzt (Endkonzentration: 2 %), mit 50-70 ml einer *S. pneumoniae*-Vorkultur beimpft und in einem 37 °C-Wasserbad inkubiert. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der OD₆₀₀ in einem Spektralphotometer (Ultrospec[®] III) (Pharmacia LKB Biotechnology) verfolgt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 wurde die Kultur sofort in einem Eiswasserbad für 10 min abgekühlt und anschließend für 10 min bei 6500-7000 Upm und 4 °C abzentrifugiert (J2-21) (Beckman Instruments). Unmittelbar vor dem Abzentrifugieren der Kultur wurden 6 ml zur späteren Sequenzanalyse entnommen (siehe 2.7.2.6). Somit konnte sichergestellt werden, dass der betreffende Stamm auch tatsächlich über den beschriebenen genetischen Hinter-

grund verfügt. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstands wurde das Pellet vorsichtig in 40 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7) resuspendiert und die Suspension unter ständigem Rühren in 120 ml kochende SDS-Lösung (5 %) getropft. Nachdem die Bakteriensuspension zugefügt worden war, wurde der gesamte Ansatz für weitere 15 min gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Überführung in Falcon-Gefäße wurde die Probe bis zum Verschicken zur Analyse für kurze Zeit bei Raumtemperatur, über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert. Verschickt wurde entweder bei Raumtemperatur oder auf Trockeneis.

Um einen vorzeitigen Verdau der Zellwand durch zelleigene Autolysine zu verhindern, wurden nach der Ernte der Zellen alle Arbeitsschritte möglichst zügig durchgeführt, die Bakteriensuspension tropfenweise zu der SDS-Lösung gegeben und die Suspension ausreichend gekocht, was beides eine schnelle Inaktivierung der Autolysine zur Folge hatte. Zudem wurden durch die Zugabe von Cholinchlorid in einer Endkonzentration von 2 % diese Enzyme inhibiert. Da die Zellwand-Zusammensetzung teilweise von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist, wurde bei der Kultivierung der Stämme stets auf konstante Bedingungen geachtet, um einen späteren Vergleich der Muropeptidprofile zu ermöglichen.

2.8.3.2 Isolierung und HPLC-Analyse der Zellwand und Muropeptide

Die Isolierung und anschließende HPLC-Analyse der Zellwand und Muropeptide, sowie die Auswertung der Daten wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Vollmer am Institute for Cell and Molecular Biosciences, Medical School der University of Newcastle upon Tyne (UK) durchgeführt.

2.9 Computergestützte Datenverarbeitung, -analyse und -abfrage

Die folgenden Computerprogramme und Datenbanken wurden zur Datenverarbeitung, -analyse und -abfrage eingesetzt:

Computerprogramme

Adobe® Photoshop® CS3 (Version 10.0, 1990-2007)

Bearbeitung von gescannten Polyacrylamidgelen und Western-Blots

Artemis (Release 11, 1998-2009, The Wellcome Trust Sanger Institute)

Lokalisation der Oligonukleotide des *S. pneumoniae* R6/TIGR4-Oligonukleotid-Sets im *S. pneumoniae* R6- und TIGR4-Genom, Ermittlung der Positionen von intergenen Bereichen im *S. pneumoniae* R6- und TIGR4-Genom

Chromas LITE (Version 2.01, 1998-2005, Technelysium Pty Ltd.)

Visualisierung und Invertieren von Nukleotid-Sequenzen

Clone Manager Professional Suite (Sci Ed Central, Clone Manager 7, Version 7.04, Align Plus 5, Version 5.04, Primer Designer 5, Version 5.04, 1994-2002, Scientific and Educational Software)

Design von Primern, Planung von Klonierungen, Erstellung von Genkarten

DeepView/Swiss-PdbViewer (Version 3.7, 1995-2001)

Darstellung der dreidimensionalen Struktur von PBP

DNAMAN (Version 4.0, 1994-1998, Lynnon BioSoft.)

Visualisierung von Nukleotid-Sequenzen

Graph (Version 4.3, Unterversion 384, 2007)

Erstellung und Normalisierung von Wachstumskurven

Microcal™ Origin® (Version 6.0, 1991-1999)

Erstellung von Wachstumskurven und Diagrammen

Microsoft® Access 2002 (1992-2001)

Abgleich von Microarray-Daten

Microsoft® Office Standard Edition 2003 (1985-2003)

diverse Verwendung

ScanArray® Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer)

Auswertung von Microarray-Daten

Datenbanken

<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>

Alignments von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen

<http://nbc3.biologie.uni-kl.de/>

Auswertung, bioinformatische Aufarbeitung und Darstellung von Microarray-Daten, BLAST-Analysen

<http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/cgi-bin/home.cgi>

Faltung von Nukleotid-Sequenzen (RNA-Strukturvorhersage)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>

Translation von Nukleotid-Sequenzen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Literaturrecherche, Abruf von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen, BLAST-Analysen

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Abruf von Strukturdateien von PBP

2.10 Bezugsquellen

Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht anders angegeben – von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem, BD, Fluka Analytical, Merck, Roth, Serva, Sigma-Aldrich.

Antibiotika

Die eingesetzten Antibiotika stammten von den folgenden Anbietern: AppliChem, Roth, Serva, Sigma-Aldrich.

Enzyme

Sofern nicht anders spezifiziert, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme von NEB bezogen.

Die Bezugsquellen aller nicht aufgeführten Chemikalien und Enzyme, sowie der verwendeten Kits, relevanten Materialien und Geräte sind jeweils im Text angegeben.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von PBP2x bei der Entwicklung der β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* bestätigt bzw. weiter untersucht werden. Im Fokus der Untersuchungen standen dabei einzelne Punktmutationen im PBP2x. Das Resistenzpotential solcher Mutationen sollte aufgedeckt und die mit dieser Art der Modifizierung zusammenhängenden physiologischen Veränderungen bzw. kompensierenden Mechanismen in der Zelle identifiziert werden. Dazu wurde eine Mutationsanalyse der Schlüsselposition Thr338 im PBP2x von *S. pneumoniae* durchgeführt und die durch eine solche Punktmutation vermittelten Phänotypen charakterisiert. Darüber hinaus wurde in die Analysen eine globale Transkriptomstudie von spontanresistenten Mutanten mit Punktmutationen im PBP2x miteinbezogen. Im Rahmen von Literaturrecherchen trat eine Publikation auf, in der es gelungen war, das *pbp2b* von *S. gordonii*, einem nahen Verwandten von *S. pneumoniae*, zu inaktivieren. Diese Veröffentlichung gab den Anstoß dazu, eine frühere Arbeit, in der das *pbp2b* von *S. pneumoniae* nicht inaktiviert werden konnte, nochmal aufzugreifen. Die dabei gewählte Strategie erschien fraglich, weshalb erneut versucht werden sollte, eine *pbp2b*-Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante von *S. pneumoniae* darzustellen und zu charakterisieren. Im ersten Teil dieses Kapitels wird auf die Mutationsanalyse von Thr338 eingegangen; der zweite Teil beschäftigt sich mit der globalen Transkriptomanalyse der spontanresistenten PBP2x-Punktmutanten und im dritten Teil werden schließlich die Ergebnisse des Versuchs zur Herstellung einer *pbp2b*-Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante von *S. pneumoniae* vorgestellt.

3.1 Mutationsanalyse der Position Thr338 im PBP2x von *Streptococcus pneumoniae*

3.1.1 Einführung einer Thr338-Punktmutation in PBP2x

Im Mosaik-PBP2x der meisten resistenten klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten, aber auch anderer oraler Streptokokken tritt eine Punktmutation an Position Thr338 in der STMK-Box auf. In der Mehrheit der Fälle ist ein T338A-Austausch zu beobachten; T338P-, T338G-, oder T338S-Mutationen sind ebenfalls beschrieben worden (Asahi *et al.*, 1999; Bergmann, 2003; Bicmen *et al.*, 2006; Carapito *et al.*, 2006a; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; du Plessis *et al.*, 2002; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002; Sanbongi *et al.*, 2004; Schmitt, 2004; Smith und Klugman, 2005). Durch enzymkinetische Studien mit löslichen PBP2x-Derivaten mit einer solchen Punktmutation (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998), sowie Rückmutation dieser Position in Mosaik-PBP2x (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Smith und Klugman, 2005), konnte dieser Mutation eine wichtige Rolle bei der β -Laktam-Resistenz zugesprochen werden. Dennoch gelang es bis dato nicht, eine Thr338-Mutation zu selektionieren, wodurch ihr alleiniger

In einem Fall war sogar eine T338S-Mutation vorhanden. T338A und T338P waren jeweils durch zwei Codons mit einer bzw. zwei Basenaustauschen vertreten (ACT → GCT, GCC; ACT → CCT, CCC), T338G lediglich durch ein Codon mit drei Basenaustauschen (ACT → GGC). Für die gerichtete Mutagenese (siehe 2.7.3.1) wurden die Substitutionen T338A, T338P, T338G und die entsprechenden Codons, welche am häufigsten in den resistenten Streptokokken zu beobachten waren, ausgewählt (T338A: GCC; T338P: CCT; T338G: GGC) (siehe Tab. 2.5).

3.1.1.2 Selektion von R6_{pbp2xT338}-Mutanten

Basierend auf früheren Beobachtungen in der Arbeitsgruppe, dass sich Thr338-Mutationen eher mit dem β-Laktam Oxacillin als mit dem standardmäßig zur Selektion von PBP2x-Mutationen eingesetzten Cefotaxim selektionieren lassen, erfolgte die Selektion der R6_{pbp2xT338}-Mutanten mit Oxacillin. Da mit einem geringen Resistenzanstieg zu rechnen war, wurden die Selektionskonzentrationen im Bereich 0,1-0,15 µg/ml, dicht über der Oxacillin-MHK des Rezipienten R6 von 0,08 µg/ml angesetzt, wobei für die Abstufung 0,01er-Schritte gewählt wurden. Mit allen drei Konstrukten und fünf Konzentrationen konnten Transformanten erhalten werden; alle Thr338-Punktmutationen vermitteln also eine selektionierbare Resistenz (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Selektion der R6_{pbp2xT338}-Mutanten.

Aufgeführt sind die bei der Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit den Plasmiden pGEM-2xT338A, pGEM-2xT338P und pGEM-2xT338G zur Selektion eingesetzten Oxacillin-Konzentrationen und erhaltenen Ergebnisse, für R6_{pbp2xT338A} alle, für R6_{pbp2xT338P} und R6_{pbp2xT338G} lediglich die mit 0,11 µg/ml Oxacillin erzielten Resultate. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert. Die Lebendkeimzahl (Positivkontrolle) gibt die Anzahl an Kolonien unter nichtselektiven Bedingungen (ohne Antibiotikum) an, die Negativkontrolle die aus einem Transformationsansatz ohne DNA unter selektiven Bedingungen (mit Antibiotikum) hervorgegangene Kolonienanzahl. Die Transformations-effizienz ist definiert als der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl.

	Oxacillin [µg/ml]	Transformanten [cfu/ml]	Lebendkeim- zahl [cfu/ml]	Transformations- effizienz [%]	Negativkontrolle [cfu/ml]
R6 _{pbp2xT338A}	0,1	2,21 x 10 ³	3,8 x 10 ⁸	5,82 x 10 ⁻⁴	3,24 x 10 ⁴
	0,11	1,44 x 10 ³	"	3,79 x 10 ⁻⁴	0
	0,12	9,0 x 10 ²	"	2,37 x 10 ⁻⁴	"
	0,13	3,48 x 10 ³	"	9,16 x 10 ⁻⁴	"
	0,14	5,0 x 10 ²	"	1,32 x 10 ⁻⁴	"
	0,15	0	"	0	"
R6 _{pbp2xT338P}	0,11	3,22 x 10 ⁷	"	11,56 x 10 ¹	0
R6 _{pbp2xT338G}	0,11	5,78 x 10 ³	"	2,78 x 10 ⁻³	0

Auf der Negativkontrolle (siehe 2.6.6.2) waren lediglich bei einer Selektionskonzentration von 0,1 µg/ml Kolonien sichtbar (3,24 x 10⁴ colony-forming units (cfu)/ml). Die höchste Trans-

formationseffizienz wurde mit der T338P-Mutation erzielt ($11,56 \times 10^1$ %), gefolgt von der T338G ($4,84 \times 10^{-3}$ %) und der T338A ($9,16 \times 10^{-4}$ %) -Substitution. Insgesamt nahm die Anzahl der erhaltenen Transformanten mit steigender Selektionskonzentration ab. Bei allen fünf Oxacillin-Konzentrationen wurden Kolonien gepickt, und die jeweilige Punktmutation im *pbp2x* durch doppelsträngige Sequenzierung bestätigt. In Anbetracht der Tatsache, dass insbesondere bei hohen β -Laktam-Konzentrationen häufig zusätzliche Resistenz-vermittelnde Mutationen in anderen Genen, wie z. B. *ciaH* oder *cpoA* auftreten (Hakenbeck *et al.*, 1999), wurden die Klone von der niedrigsten Selektionskonzentration, bei der kein Wachstum auf der Negativkontrolle zu verzeichnen war (0,11 $\mu\text{g/ml}$), einer weiteren Analyse unterzogen.

3.1.2 Eine Thr338-Punktmutation und die β -Laktam-Resistenz

Im Rahmen enzymkinetischer Untersuchungen der Thr338-Punktmutation konnte mit den drei Aminosäuresubstitutionen Thr \rightarrow Ala, Thr \rightarrow Pro und Thr \rightarrow Gly eine Reduktion der Acylierungseffizienzen für Penicillin G und Cefotaxim festgestellt werden (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998). Dabei bewirkte die T338A-Mutation eine 3 bis 4fache bzw. 2fache Reduktion der Acylierung für Benzylpenicillin bzw. Cefotaxim. Bei den Mutationen T338P und T338G war die Acylierungseffizienz für Cefotaxim bereits um das 5fache bzw. 8fache reduziert. Hierbei schien die Frage von besonderem Interesse, ob diese unterschiedlichen Acylierungseffizienzen sich auch in Unterschieden in der MHK bemerkbar machen.

3.1.2.1 β -Laktam-Resistenz der R6_{*pbp2x*T338}-Mutanten

Zur Beurteilung des Resistenzpotentials der drei Thr338-Punktmutationen wurde die MHK der R6_{*pbp2x*T338}-Mutanten für die β -Laktame Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin bestimmt. Die Detektion der dabei zu erwartenden geringen Resistenzunterschiede erfolgte mithilfe des Plattenverdünnungstests, da diese Testmethode gerade im Bereich niedriger Antibiotikakonzentrationen eine feine und genaue Abstufung ermöglicht (siehe 2.6.5). Durch eine sehr enge Abstufung der zu testenden Konzentrationen in 0,01 $\mu\text{g/ml}$ -Schritten, konnten abhängig von der jeweiligen Punktmutation im PBP2x, unterschiedliche Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren beobachtet werden (Abb. 3.2). Wie aus Abb. 3.2 ersichtlich, wurden bei allen drei R6_{*pbp2x*T338}-Mutanten, verglichen mit dem Parentalstamm R6, die höchsten MHK-Werte mit Oxacillin erzielt (bis zu 3facher Anstieg der MHK von R6), gefolgt von Piperacillin (bis zu 2,5facher Anstieg der MHK von R6) und Cefotaxim (2facher Anstieg der MHK von R6), während für Benzylpenicillin die MHK-Werte kaum erhöht waren (1,5facher Anstieg der MHK von R6). Insgesamt ließ die T338G-Mutation den größten und die T338A-Substitution den geringsten Effekt auf die Resistenz erkennen. Dabei fiel auf, dass der T338P-Austausch, im Hinblick auf die übrigen

β -Laktame, einen vergleichsweise geringfügigen Resistenzanstieg für Piperacillin bewirkte. Unter Berücksichtigung einer früheren Arbeit, in der eine Temperatur-Hypersensitivität für Cefotaxim in einer PBP2x-Mutante auftrat (Krauß *et al.*, 1996), wurde die Cefotaxim-MHK der R6_{pbp2xT338}-Mutanten auch bei 30 °C Inkubation ermittelt. Hierbei konnten jedoch keine Unterschiede zu den bei 37 °C Inkubation erhaltenen MHK-Werten festgestellt werden.

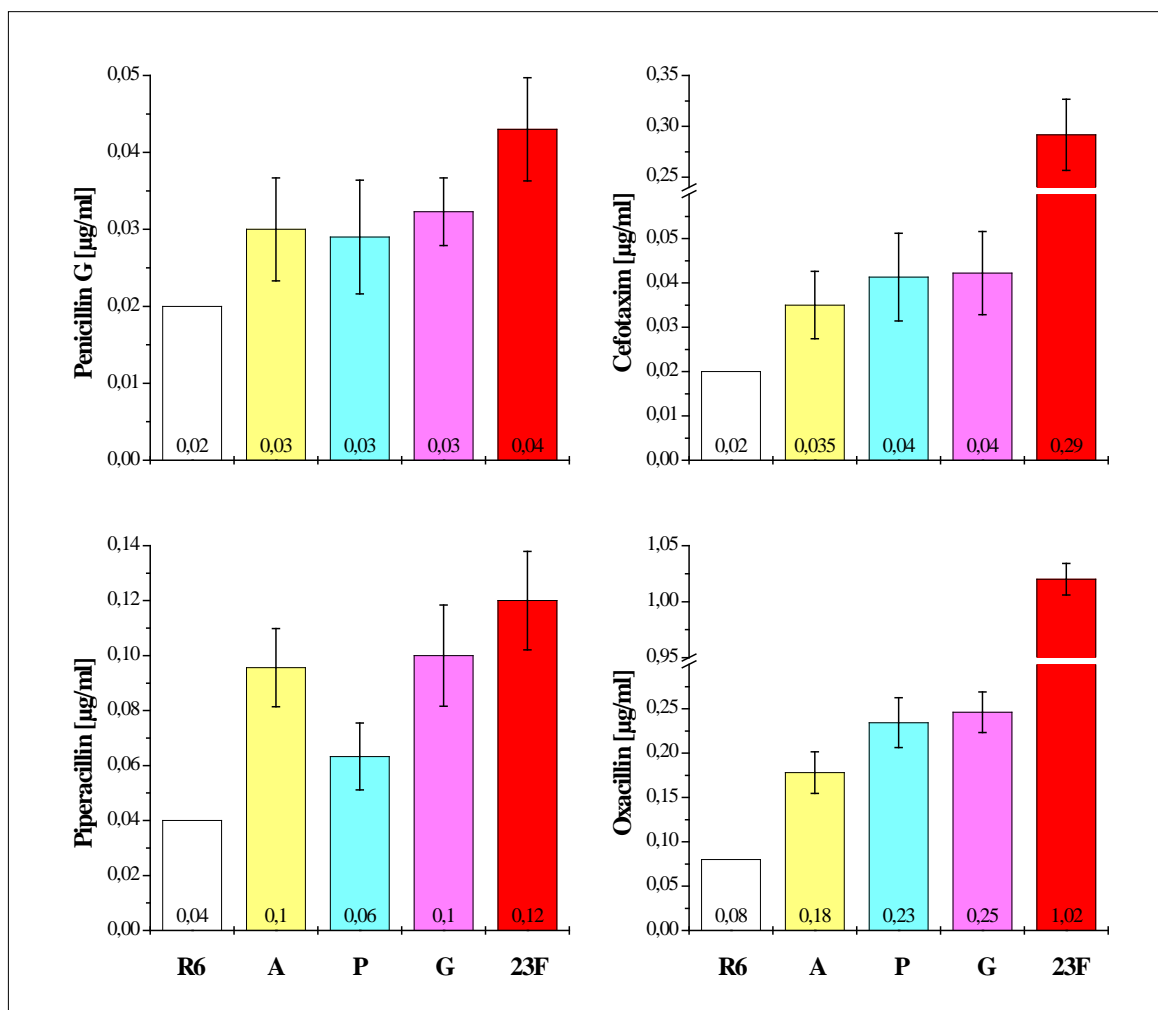


Abb. 3.2: β -Laktam-Resistenz der R6_{pbp2xT338}-Mutanten.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für die β -Laktame Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin der R6_{pbp2xT338}-Mutanten und zum Vergleich von R6 und der R6_{pbp2xT338}-Transformante sind als Säulen in verschiedenen Farben dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen erfolgte in 0,01er [$\mu\text{g/ml}$] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C abgelesen, wobei die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die schwarzen Balken die Standardabweichung an, die Zahlen am Boden der Säulen die gerundeten Mittelwerte. Säulen: R6; A: R6_{pbp2xT338A}; P: R6_{pbp2xT338P}; G: R6_{pbp2xT338G}; 23F: R6_{pbp2x2349}.

Zum Vergleich wurde die MHK für Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin, die durch ein Mosaik-PBP2x eines klinischen Isolats vermittelt wird, bestimmt. Dazu wurde die R6_{pbp2x2349}-Transformante herangezogen, welche das *pbp2x*-Mosaikgen des 1992 in Spanien isolierten

klinischen Pneumokokkenstammes 2349, eines Vertreters des weitverbreiteten hoch-Penicillin- und multiresistenten 23F-Klons, besitzt (Reichmann *et al.*, 1997). Das *pbp2x* dieser R6-Transformante enthält ein 1407 bp großes Stück des insgesamt 1537 bp großen Mosaikblocks von 2349; die letzten 131 bp am 3'-Ende fehlen (Abb. 3.3). Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz dieses Blocks unterscheidet sich in 19,0 bzw. 14,5 % von der entsprechenden R6-Sequenz. Von der flankierenden 435 bp großen Region am 5'-Ende des Mosaikblocks sind lediglich die letzten 117 bp am 3'-Ende im *pbp2x* von R6_{*pbp2x2349*} vorhanden. Dieser Bereich zeigt mit 2,5 bzw. 2,3 % Unterschied auf Nukleotid- bzw. Aminosäureebene eine geringere Divergenz. Das Mosaik-PBP2x weist den Thr → Ala-Austausch an Position 338 im aktiven Zentrum auf (siehe Abb. 3.1).

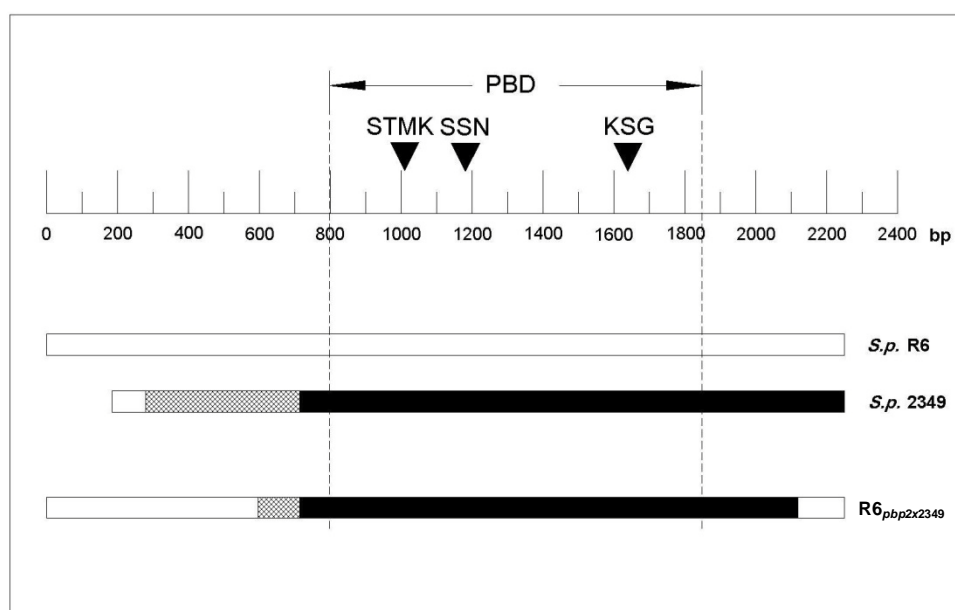


Abb. 3.3: Mosaikstruktur des *pbp2x* der Transformante R6_{*pbp2x2349*}.

Dargestellt ist das *pbp2x*-Mosaikgen der Transformante R6_{*pbp2x2349*}. Der obere weiße Balken repräsentiert das *pbp2x*-Gen des β -Laktam-sensitiven Stammes *S. pneumoniae* R6. Darunter befinden sich die *pbp2x*-Mosaikgene des hoch-Penicillin- und multi-resistenten Pneumokokkenstammes 2349 und der Transformante. Die Nukleotidsequenz des schwarzen Blocks (Mosaikblocks) unterscheidet sich in 19,0 % von der entsprechenden R6-Sequenz, die des davor liegenden rautierten Blocks in 2,5 %. Die Sequenz der weißen Regionen weist eine 100 %ige Übereinstimmung mit der von R6 auf. Zur Orientierung ist die Lage der drei konservierten Boxen von PBP2x (STMK, SSN und KSG) innerhalb der Penicillin-Binde-Domäne (PBD) durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet.

Abk.: *S.p.* (*Streptococcus pneumoniae*)

Auch R6_{*pbp2x2349*} zeigte den stärksten Resistenzanstieg mit Oxacillin (Abb. 3.2). Während die Benzylpenicillin- und Piperacillin-MHK der R6_{*pbp2x2349*}-Transformante sich kaum von der entsprechenden MHK der Punktmutanten unterschied (2 bzw. 3facher Anstieg der MHK von R6), waren mit Cefotaxim und Oxacillin deutlich höhere Werte zu verzeichnen (14,5 bzw. 13facher Anstieg der MHK von R6).

3.1.2.2 β -Laktam-Affinität der PBP2_{xT338}-Derivate

Im Folgenden stellte sich nun die Frage, ob sich die unterschiedlichen β -Laktam-Affinitäten der PBP2_{xT338}-Mutanten durch Markierung der PBP2_x mit dem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat BocillinTM FL detektieren lassen (siehe 2.8.1). Um die optimalen Bedingungen für eine solche Visualisierung zu ermitteln, wurden zunächst einmal Kinetikstudien mit Zelllysaten der R6_{pbp2xT338G}-Mutante durchgeführt, da von der T338G-Punktmutation der größte Effekt auf die Resistenz ausgeht und demnach auch erwartet wurde, dass Unterschiede in der β -Laktam-Affinität deutlicher hervortreten (siehe 2.8.1.2). Beim Austesten verschiedener Temperaturen (0, 4, 10, 15, 21, 25, 30 und 37 °C) und Inkubationszeiten (0,5, 1, 2, 4, 8 und 16 min) für die Markierung, erschien eine Inkubationszeit von 2 min und eine Inkubationstemperatur von 20 bzw. 30 °C am günstigsten. Unter diesen Bedingungen gelang es schließlich mit 0,01-0,3 μ M BocillinTM FL die Unterschiede in der β -Laktam-Affinität der PBP2_{xT338}-Derivate sichtbar zu machen (Abb. 3.4).

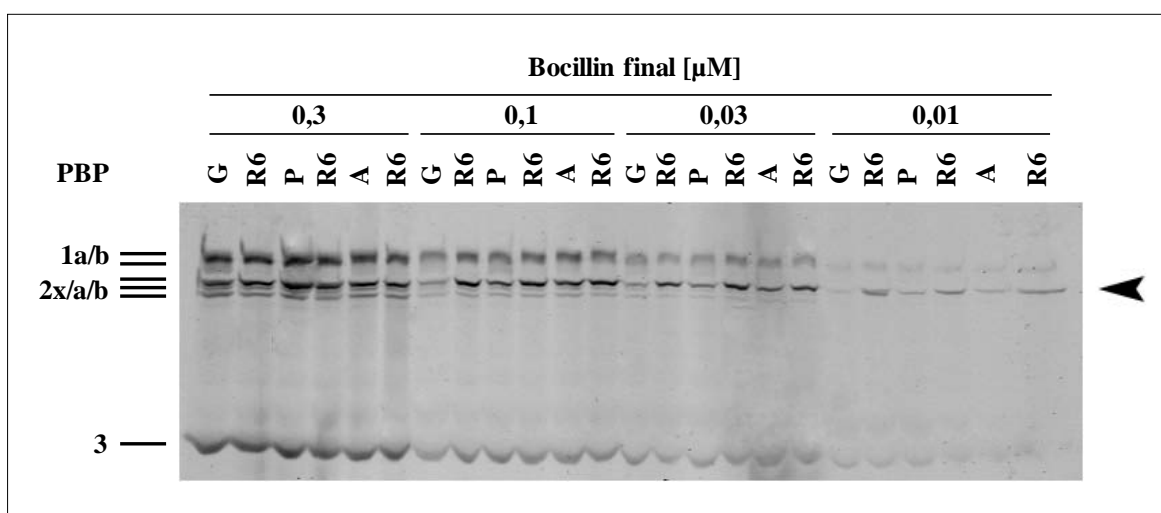


Abb. 3.4: β -Laktam-Affinität der PBP2_{xT338}-Derivate.

Die Abbildung zeigt das PBP-Profil der R6_{pbp2xT338}-Mutanten und zum Vergleich von R6 unter den zur Visualisierung von Unterschieden in der β -Laktam-Affinität der PBP2_{xT338}-Derivate ermittelten optimalen Bedingungen. Zelllysate der Mutanten und von R6 wurden für 2 min bei 20 °C mit 0,01, 0,03, 0,1 und 0,3 μ M BocillinTM FL (final) inkubiert und die Bocillin-PBP-Komplexe nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE in einem 7,5 %igen Gel mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:1,1 mittels Fluorographie visualisiert. Die Striche auf der linken Seite markieren die Laufhöhe der jeweiligen PBP, die Pfeilspitze speziell die Lage von PBP2_x. Spuren: R6; A: R6_{pbp2xT338A}; P: R6_{pbp2xT338P}; G: R6_{pbp2xT338G}.

Wie in Abb. 3.4 zu erkennen ist, konnte bei 20 °C mit allen Bocillin-Konzentrationen das jeweilige mutierte PBP2_x noch markiert werden. Allerdings machte sich ab einer Konzentration von $\leq 0,1$ μ M die geringere β -Laktam-Affinität der PBP2_{xT338}-Varianten in einer, verglichen mit dem Parentalstamm R6, schwächeren PBP2_x-Bande bemerkbar. In Übereinstimmung mit den beobachteten Acylierungseffizienzen (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998) und Resistenzen (siehe 3.1.2.1), ließ sich das PBP2_{xT338A} noch am besten detektieren, gefolgt von dem PBP2_{xT338P}, während das

PBP2_{xT338G} zum Teil kaum noch sichtbar war. Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und mit 0,02 bzw. 0,03 µM BocillinTM FL war dieses Derivat als Bocillin-Komplex nicht mehr nachweisbar (nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass eine Reduktion der PBP2x-Menge in den R6_{pbp2xT338}-Mutanten für den Phänotyp der schwachen PBP2x-Markierung verantwortlich war, wurde ein Western-Blotting mit PBP2x-Antikörpern durchgeführt (siehe 2.8.2). Dabei konnte keine Veränderung in der Proteinmenge der Punktmutanten im Vergleich zu R6 festgestellt werden (Abb. 3.5). Es fiel lediglich eine geringfügige Variabilität in der elektrophoretischen Mobilität des PBP2x der Transformante R6_{pbp2x2349} auf.

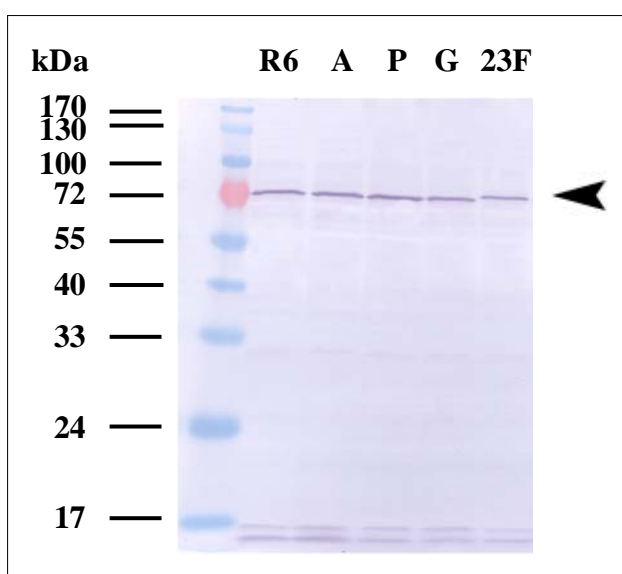


Abb. 3.5: PBP2x in den R6_{pbp2xT338}-Mutanten. Gezeigt ist eine PVDF-Membran mit dem durch Western-Blotting detektierten PBP2x der R6_{pbp2xT338}-Mutanten und zum Vergleich von R6 und der R6_{pbp2x2349}-Transformante. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE in einem 11 %igen SDS-Gel mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8 wurden diese durch Elektrobloiting auf die Membran transferiert und PBP2x über eine Antigen-Antikörperreaktion mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper (anti-PBP2x rabbit) (1:10 000 in PBST) (Maurer *et al.*, 2008) nachgewiesen. Die Molekulargewichte des Molekulargewichtstandards sind auf der linken Seite angegeben; die Pfeilspitze kennzeichnet die Lage des visualisierten PBP2x. Zu beachten ist hierbei die geringfügig veränderte elektrophoretische Mobilität des Mosaik-PBP2x

der Transformante R6_{pbp2x2349}. Spuren: 1: Molekulargewichtstandard (peqGOLD Protein-Marker IV Pre-stained); R6; A: R6_{pbp2xT338A}; P: R6_{pbp2xT338P}; G: R6_{pbp2xT338G}; 23F: R6_{pbp2x2349}.

3.1.3 Eine Thr338-Punktmutation in Kombination mit einem Mosaik-PBP1a

Mutationen in PBP2x sind Voraussetzung für hohe β-Laktam-Resistenz, welche durch zusätzliche Veränderungen in PBP2b und PBP1a erreicht wird (Barcus *et al.*, 1995). Dabei wird insbesondere durch die Kombination eines Mosaik-PBP2x mit einem Mosaik-PBP1a ein hohes Resistenzniveau zu Cephalosporinen der dritten Generation wie dem Cefotaxim erzielt (Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992a). In diesem Zusammenhang war es von Interesse zu klären, ob eine einzelne Punktmutation an Position 338 im PBP2x bereits für die Selektion eines Mosaik-PBP1a ausreicht und ob und bis zu welchem Grad eine solche Kombination eine Resistenz vermittelt.

3.1.3.1 Selektion von R6_{pbp2xT338pbp1a2349}-Transformanten

Als Donor für das Mosaik-PBP1a diente der bereits erwähnte klinische Pneumokokkenstamm 2349, Serotyp 23F (siehe 3.1.2.1). Das *pbp1a* dieses Stammes verfügt über einen 1166 bp großen

Mosaikblock, dessen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz sich in 18,9 bzw. 15,3 % von der entsprechenden R6-Sequenz unterscheidet (Abb. 3.6). Vor diesem Block befindet sich eine 527 bp große Region, die einen Unterschied von 1,7 bzw. 1,4 % auf Nukleotid- bzw. Aminosäureebene zeigt. Für die Transformation der drei R6_{pbp2xT338}-Mutanten wurde das Plasmid pGEM-1aRes verwendet, welches ein 1920 bp großes Fragment des 2349-*pbp1a* mit dem gesamten Mosaikblock enthält.

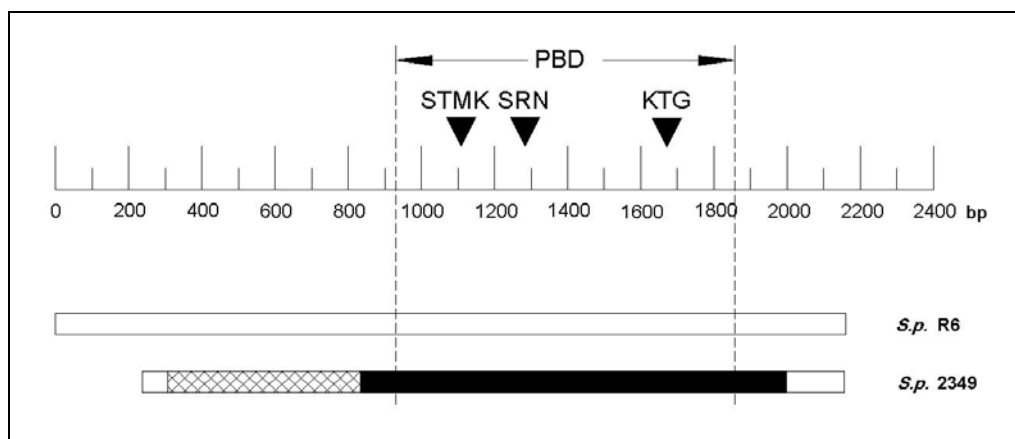


Abb. 3.6: Mosaikstruktur des *pbp1a* von *Streptococcus pneumoniae* 2349.

Abgebildet ist das *pbp1a*-Mosaikgen des hoch-Penicillin- und multiresistenten Pneumokokkenstammes 2349. Das *pbp1a*-Gen des β -Laktam-sensitiven Stammes R6 ist als weißer Balken zu erkennen. Bei dem unteren Balken handelt es sich um das *pbp1a*-Mosaikgen von 2349. Die Nukleotidsequenz des durch den schwarzen Block repräsentierten Mosaikblocks zeigt einen Unterschied von 18,9 % zu der entsprechenden Sequenz von R6; die sich davor befindende rautierte Region einen von 1,7 %. Die Nukleotidsequenz der weißen Bereiche ist identisch zu der von R6. Die Position der drei konservierten Boxen von PBP1a (STMK, SRN und KTG) innerhalb der Penicillin-Binde-Domäne (PBD) ist durch schwarze Dreiecke vermerkt.

Selektioniert wurde mit Penicillin G, Cefotaxim und Oxacillin, da sowohl PBP2x als auch PBP1a eine hohe Affinität für diese β -Laktame aufweisen und demnach bei der hier gegebenen PBP-Konstellation mit einem selektionierbaren Resistenzanstieg zu rechnen war. Als Selektionskonzentrationen wurden Werte gewählt, die leicht oberhalb der MHK des jeweiligen Rezipienten lagen (siehe Abb. 3.2): für Benzylpenicillin im Bereich 0,05-0,1 $\mu\text{g/ml}$ (für alle drei R6_{pbp2xT338}-Mutanten), für Cefotaxim im Bereich 0,035-0,09 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338A}), 0,045-0,1 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338P}), 0,055-0,11 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338G}) und für Oxacillin im Bereich 0,17-0,27 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338A}), 0,23-0,36 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338P}), 0,24-0,34 $\mu\text{g/ml}$ (für R6_{pbp2xT338G}). Fünf Versuche, R6_{pbp2xT338pbp1a2349}-Transformanten zu selektionieren blieben erfolglos.

3.1.3.2 Selektion einer R6_{pbp2xC606pbp1a2349}-Transformante

Die Tatsache, dass ein PBP2x mit einer einzelnen Punktmutation in Kombination mit einem Mosaik-PBP1a keine Selektion erlaubt, führt zu folgenden Vermutungen: Erstens, die einzelne Mutation in PBP2x reicht als Modifizierung für eine primäre β -Laktam-Resistenzdeterminante im

Hinblick auf die Teilnahme an der Resistenz einer sekundären Determinante wie PBP1a nicht aus. Zweitens, das Resistenzpotential der einzelnen Mutation in PBP2x genügt nicht für ein Eingreifen von PBP1a ins „Resistenzgeschehen“ und vor allem für die Selektion eines niederaffinen PBP1a. Was letzteres angeht, so suggeriert eine Arbeit über *S. pneumoniae* die Existenz eines Schwellenwertes, ab dem PBP1a erst an der Resistenzentwicklung partizipiert (Smith und Klugman, 1998). Zur Überprüfung dieser Annahmen wurde die Transformante R6_{pbp2x}C606-T6, welche das *pbp2x* von C606 besitzt, mit dem 2349-*pbp1a* in dem Plasmid pGEM-1aRes (siehe 3.1.3.1) transformiert. Das PBP2x von C606 enthält die vier Aminosäureaustausche M289T, G422D, G597D und G601V, verteilt über die gesamte Transpeptidase-Domäne (Aminosäure 266-616). Es vermittelt eine Cefotaxim-MHK von 0,05-0,1 µg/ml bei 37 °C und 0,25-0,3 µg/ml bei 30 °C Inkubation, zeigt also eine Temperatur-Hypersensitivität für Cefotaxim. Im Ganzen erfüllt dieses PBP2x alle der oben genannten Kriterien: Es verfügt über mehr als eine Punktmutation und somit über eine stärkere Veränderung als das PBP2x_{T338} und legt darüber hinaus ein höheres Resistenzpotential an den Tag, welches sogar das des PBP2x₂₃₄₉ erreicht.

Selektioniert wurde mit Cefotaxim in einem Konzentrationsbereich von 0,05-1,0 µg/ml oberhalb der entsprechenden MHK des Rezipienten R6_{pbp2x}C606, da sich dieses Cephalosporin hervorragend für die Selektion eines niederaffinen PBP2x und PBP1a eignet und gerade bei dieser PBP-Kombination mit einem starken Anstieg der Cefotaxim-Resistenz zu rechnen war. Aber auch hier gelang es, unabhängig von der Temperatur (phänotypische Expression und anschließende Inkubation bei 30 oder 37 °C (siehe 2.6.6.2)) oder Zugabe von CSP, trotz mehrmaligen Versuchen nicht, R6_{pbp2x}C606_{pbp1a}2349-Transformanten zu selektionieren.

Demnach liegt der Grund für die erfolglose Selektion von PBP2x-Punktmutanten mit einem niederaffinen Mosaik-PBP1a vermutlich nicht in der Höhe der durch PBP2x vermittelten Resistenz, sondern in der Natur seiner Veränderungen.

3.1.3.3 β-Laktam-Resistenz einer R6_{pbp2x}T338G_{pbp1a}2349-Transformante

Um dennoch den Effekt der Kombination einer PBP2x-Punktmutation mit einem Mosaik-PBP1a untersuchen zu können, wurde auf eine Strategie zurückgegriffen, welche die β-Laktam-Selektion umging. Dabei wurde die sogenannte Janus-Kassette verwendet, eine bicistronische Kassette, die einen Kanamycin-Resistenz- und Streptomycin-Sensitivitäts-Phänotyp in einem Streptomycin-resistenten genetischen Hintergrund vermittelt und somit den Austausch von Genen durch negative Selektion ermöglicht (Sung *et al.*, 2001). Voraussetzung ist dabei, dass das betreffende Gen nicht essentiell ist (was für *pbp1a* zutrifft (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999)), da es durch die Integration der Kassette im ersten Schritt zu seiner Unterbrechung kommt. Als Rezipient für die Einführung des 2349-*pbp1a* mithilfe der Janus-Kassette diente die R6_{pbp2x}T338G-Mutante, da diese den größten Effekt auf die Resistenz zeigte, und von der demnach auch zu erwarten war, dass ein Resistenzanstieg mit einem Mosaik-*pbp1a* deutlicher sichtbar wird, als mit den anderen beiden

Thr338-Punktmutanten. Nach erfolgreicher Anwendung der Janus-Kassette (siehe 2.7.3.2) ergab die Sequenzanalyse des *pbp1a* von zehn Transformanten, die den gewünschten Phänotyp zeigten, dass zum Teil sehr unterschiedliche Stücke des 2349-*pbp1a* rekombiniert hatten (nicht gezeigt). Vier der Transformanten verfügten über das gesamte Mosaik-*pbp1a*, wobei eine zur weiteren Untersuchung ausgewählt wurde.

Die Bestimmung der MHK dieser Transformante für Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin offenbarte, dass kein Resistenzanstieg durch das PBP1a vermittelt wird (Abb. 3.7). Im Gegenteil, überraschenderweise war sogar für alle vier β -Laktame ein Resistenzabfall im Vergleich zur Ausgangsmutante R6_{*pbp2xT338G*} zu verzeichnen, was die Erklärung für die erfolglose Selektion von R6_{*pbp2xT338pbp1a2349*}-Transformanten lieferte. Die stärkste Reduktion der Resistenz konnte mit Oxacillin und Piperacillin beobachtet werden, während die Resistenzabnahme für Penicillin G und Cefotaxim eher gering, aber detektierbar ausfiel. Im Gegensatz dazu zeigte die R6_{*pbp2x2349pbp1a2349*}-Transformante den bekannten signifikanten 3fachen Anstieg der MHK für Cefotaxim (Abb. 3.7). Die Resistenz für Benzylpenicillin, Piperacillin und Oxacillin schien hingegen unbeeinflusst zu sein; hier konnte sogar eine leichte Hypersensitivität gegenüber Penicillinen im Allgemeinen festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang war es interessant zu überprüfen, ob bereits die Inaktivierung von *pbp1a* durch die Integration der Janus-Kassette im ersten Schritt der Herstellung der R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349*}-Transformante zu einem Resistenzabfall führte. Wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist, kam es schon in R6_{*pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL⁺*} zu einem Rückgang der MHK für alle vier β -Laktame im Vergleich zu R6_{*pbp2xT338G*}; die MHK-Werte der R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349*}-Transformante wurden jedoch nur mit Cefotaxim erreicht bzw. sogar noch unterschritten. Für eine R6_{*pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL⁺*}-Transformante, die durch Transformation des Streptomycin-resistenten Derivats R6_{*pbp2x2349rpsLK56T*} mit dem in 2.7.3.2 dargestellten *pbp1a*-Janus-Konstrukt hergestellt wurde, ergab sich hingegen ein etwas anderes Bild. Hier war ausschließlich mit Cefotaxim eine Resistenzabnahme zu verzeichnen (1,5facher Abfall der MHK von R6_{*pbp2x2349*}); die MHK für die Penicilline blieb etwa auf dem Niveau der MHK der Ausgangstransformante R6_{*pbp2x2349*}. Da dieser Befund bei einer späteren MHK-Bestimmung auch im Fall der R6_{*pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL⁺*}-Mutante auftrat (Abb. 3.8) und sich auch im vorliegenden Experiment keine starke Abweichung der Penicillin-Resistenz von der der Ursprungsmutante R6_{*pbp2xT338G*} manifestierte, kann aber davon ausgegangen werden, dass sich die *pbp1a*-Inaktivierungskonstrukte der beiden PBP2x-Mutanten im Gegensatz zu den 2349-*pbp1a*-Derivaten bezüglich der Resistenz ähnlich verhielten.

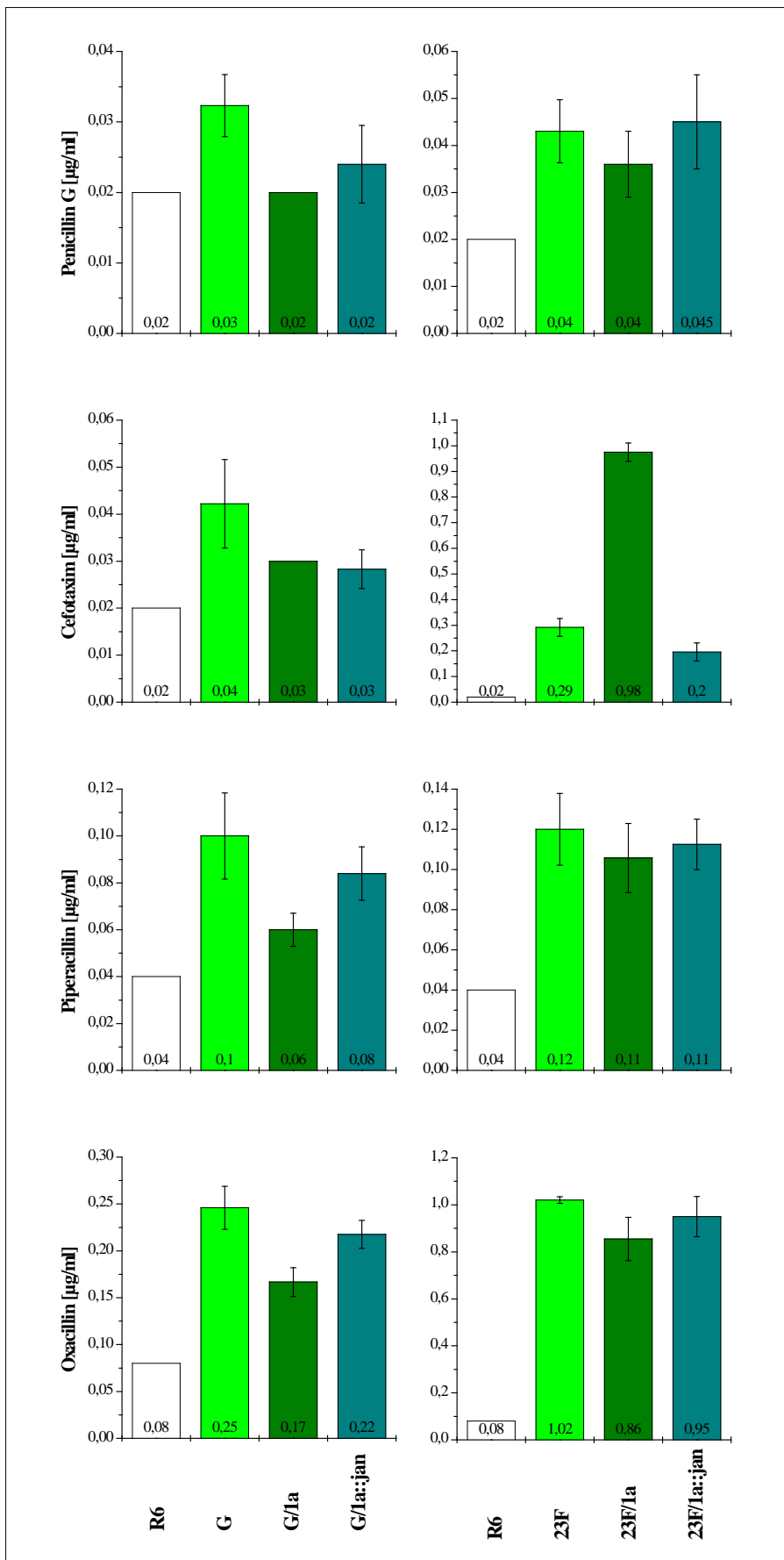


Abb. 3.7: β -Laktam-Resistenz der $R6_{pbp2x-T338Gpbp1a2349^-}$ -Transformante.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für die β -Laktame Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin der $R6_{pbp2x-T338Gpbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2x-T338Gpbp1a:aphIII-rpsL^-}$, $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante und zum Vergleich von R6, der $R6_{pbp2x-2349pbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2x-2349pbp1a:aphIII-rpsL^-}$ und $R6_{pbp2x2349^-}$ -Transformante sind als Säulen in verschiedenen Grüntönen dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen erfolgte in 0,01er [$\mu\text{g/ml}$] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C abgelesen, wobei die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die schwarzen Balken die Standardabweichung an, die Zahlen am Boden der Säulen die gerundeten Mittelwerte. Säulen: R6; G: $R6_{pbp2xT338G}$; G/1a: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$; G/1a:jan: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a:aphIII-rpsL^-}$; 23F: $R6_{pbp2x2349^-}$; 23F/1a: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349^-}$; 23F/1a:jan: $R6_{pbp2x-2349pbp1a:aphIII-rpsL^-}$.

Die $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$ -Mutante verfügt über ein nichtfunktionelles PBP1a, da die Transpeptidase-Domäne (Aminosäure 304 bis 627) (Contreras-Martel *et al.*, 2006; Job *et al.*, 2003), zwischen Aminosäure 363 und 366 unterbrochen ist. Da bei der Konstruktion des zu transformierenden *pbp1a*-Janus-Fragments in erster Linie von Bedeutung war, eine größtmögliche Fläche zur anschließenden Rekombination zur Verfügung zu stellen, wurden keine Stücke von *pbp1a* deletiert, sondern das Gen lediglich in zwei Teilen amplifiziert (siehe 2.7.3.2). Den dabei intakt gebliebenen 5'- und 3'-Regionen wurde keine weitere Beachtung geschenkt, obwohl einem Bereich der N-terminalen Domäne von PBP1a (Aminosäure 31 bis 245) eine wichtige Funktion bei der Zellwandsynthese zukommt, nämlich die einer Transglykosylase (Contreras-Martel *et al.*, 2006). Im Hinblick auf den bei der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$ -Transformante auftretenden stärkeren Abfall der Penicillin G-, Piperacillin- und Oxacillin-Resistenz im Vergleich zur *pbp1a*-Inaktivierungsmutante $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$ kamen nun die folgenden Fragen auf: Sollte sich das 2349-*pbp1a* in dem genetischen Hintergrund der T338G-Punktmutation aufgrund seiner starken Modifizierung wie ein deletiertes Protein verhalten und die in der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$ -Mutante beobachtete „Restresistenz“ von der unveränderten, unversehrt gebliebenen Transglykosylase-Domäne herühren? Würde also demnach durch eine Deletion von *pbp1a* in $R6_{pbp2xT338G}$ die Resistenz für alle vier β -Laktame auf das Resistenzniveau der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$ -Transformante fallen? Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine In-frame-Deletion von *pbp1a* in $R6_{pbp2xT338G}$ und zum Vergleich in $R6_{pbp2x2349}$ vorgenommen (siehe 2.7.3.3). Hierfür wurde *pbp1a* bis auf das Start- bzw. Stopcodon komplett durch das Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Gen *aphIII* der Resistenzkassette des Plasmids pDG782 ersetzt. Dabei wurde der Resistenzmarker mit SD-Sequenz, aber ohne Promotor und Terminator integriert. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, wie sie in den *pbp1a*-Janus-Mutanten gegeben waren, wurden die Streptomycin-resistenten Derivate $R6_{pbp2xT338GrsLK56T}$ und $R6_{pbp2x2349rsLK56T}$ als Rezipienten für das Deletionskonstrukt herangezogen. Im Folgenden wurde die Penicillin G-, Cefotaxim-, Piperacillin- und Oxacillin-MHK der konstruierten $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII^-}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII^-}$ -Mutanten bestimmt und mit den MHK-Werten, der mitgetesteten entsprechenden *pbp1a*-Janus-Mutanten verglichen. Wie aus Abb. 3.8 hervorgeht, fiel die Piperacillin- und Oxacillin-Resistenz von $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII^-}$ bei Abwesenheit des vollständigen PBP1a immer noch nicht auf das Resistenzniveau der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$ -Transformante. Dennoch schien der Bereich am 5'-Ende von PBP1a nicht ganz unbeteiligt an der Resistenzentstehung zu sein, da es durch die Deletion von *pbp1a* in $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII^-}$ nochmals zu einer leichten Abnahme der MHK im Vergleich zur Inaktivierung von *pbp1a* in $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$ kam.

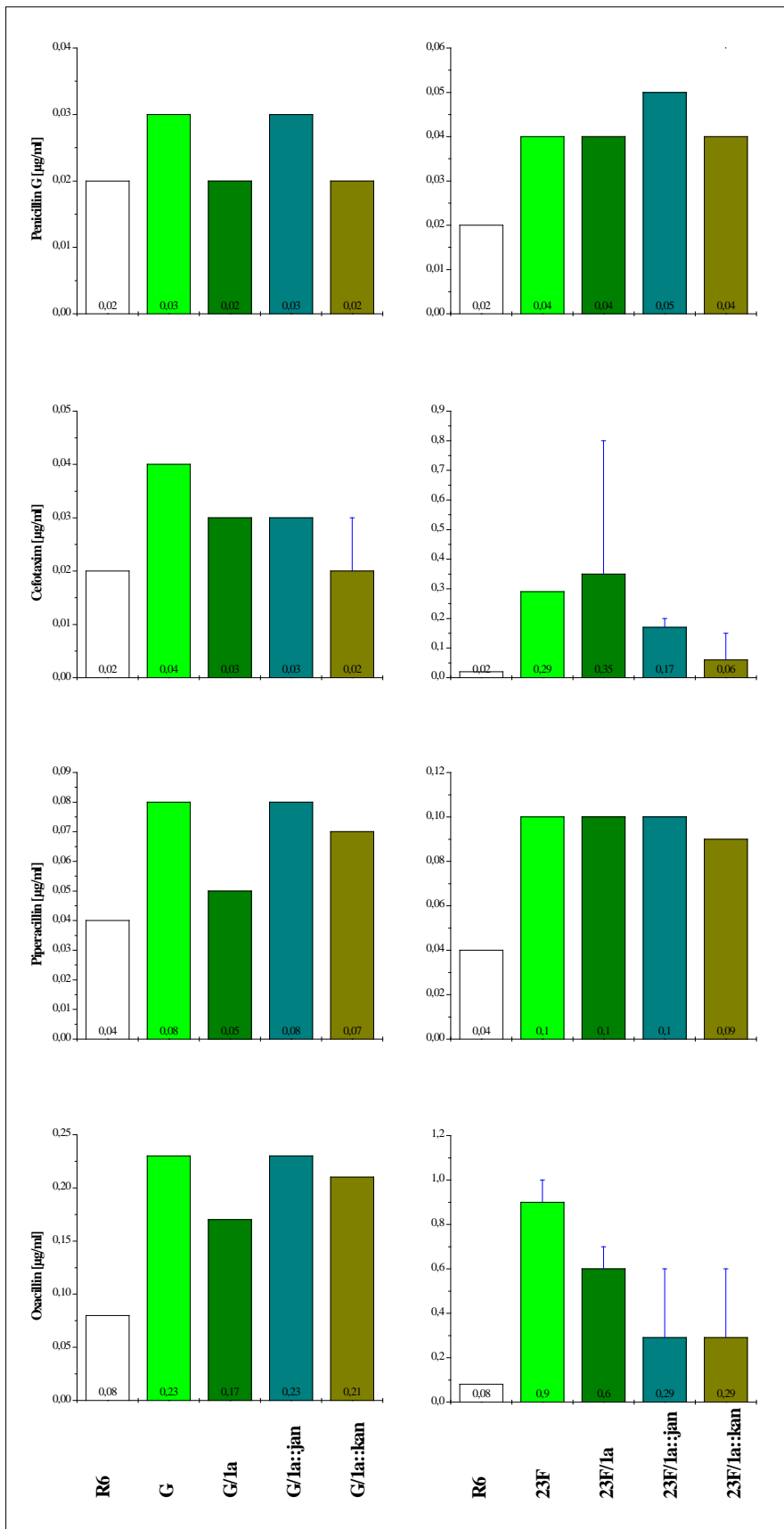


Abb. 3.8: β -Laktam-Resistenz der $R6_{pbp2x-T338Gpbp1a::aphIII^-}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII^-}$ Mutante.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für die β -Laktame Penicillin G, Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$ und zum Vergleich von $R6$ sind als Säulen in verschiedenen Grüntönen dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen erfolgte bis zu einer Konzentration von 0,35 $\mu\text{g/ml}$ in 0,01er, ab 0,6 $\mu\text{g/ml}$ in 0,1er [$\mu\text{g/ml}$] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C abgelesen, wobei die MHK-Werte (bei 0,01er Abstufung) bzw. -Bereiche (bei 0,1er Abstufung und dreimaliger Bestimmung) aus einer (Penicillin G, Piperacillin, Oxacillin) bzw. drei unabhängigen Bestimmungen (Cefotaxim) nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die blauen Balken die Bereiche an, in denen sich die MHK befindet, die Zahlen am Boden der Säulen den entsprechenden MHK-Wert bzw. Beginn des MHK-Bereichs. Säulen: $R6$; G : $R6_{pbp2xT338G}$; $G/1a$: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$; $G/1a::jan$: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$; $G/1a::kan$: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$; $23F$: $R6_{pbp2x2349}$; $23F/1a$: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$; $23F/1a::jan$: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$; $23F/1a::kan$: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$.

$G/1a::kan$: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII^-}$; $23F$: $R6_{pbp2x2349}$; $23F/1a$: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$; $23F/1a::jan$: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$; $23F/1a::kan$: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$.

Ein Resistenzabfall für alle vier β -Laktame trat auch in der *pbp1a*-Deletionstransformante $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII}$ verglichen mit dem *pbp1a*-Inaktivierungsderivat $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$ auf, wobei sich hier aber im Gegensatz zu der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII}$ -Mutante eine signifikant starke Reduktion der Cefotaxim-MHK hervortat (von 0,19 auf 0,13 $\mu\text{g/ml}$).

Diese Befunde deuteten darauf hin, dass das 2349-PBP1a in der PBP2x-Punktmutante bezüglich der Resistenz ein ähnliches jedoch nicht gleiches Verhalten an den Tag legt wie eine *pbp1a*-Deletion. Gleichzeitig sieht es so aus, als ob allein die Präsenz eines PBP1a, auch wenn es nicht in niederaffiner Form vorliegt, unterstützend für die Cefotaxim-Resistenz wirkt, ein Effekt, der insbesondere bei der $R6_{pbp2x2349}$ -Transformante zum Vorschein kommt. Zudem ist davon auszugehen, dass die Transglykosylase-Aktivität in einem geringen Maße ebenfalls zur β -Laktam-Resistenz beiträgt. Auch wenn es sich hierbei um vergleichsweise geringfügige Differenzen handelt, sind trotz allem klare Tendenzen erkennbar.

Der in der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ -Transformante beobachtete Resistenzabfall könnte gegebenenfalls aus Veränderungen in der Transkriptions- oder Translationseffizienz von *pbp1a* resultieren. Um auszuschließen, dass solche Effekte durch mögliche Mutationen in der Promotorregion hervorgerufen wurden, erfolgte eine Sequenzierung dieses Bereichs in $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$. Darüber hinaus wurde die PBP1a-Menge in diesen Mutanten mittels SDS-PAGE und Western-Blotting kontrolliert.

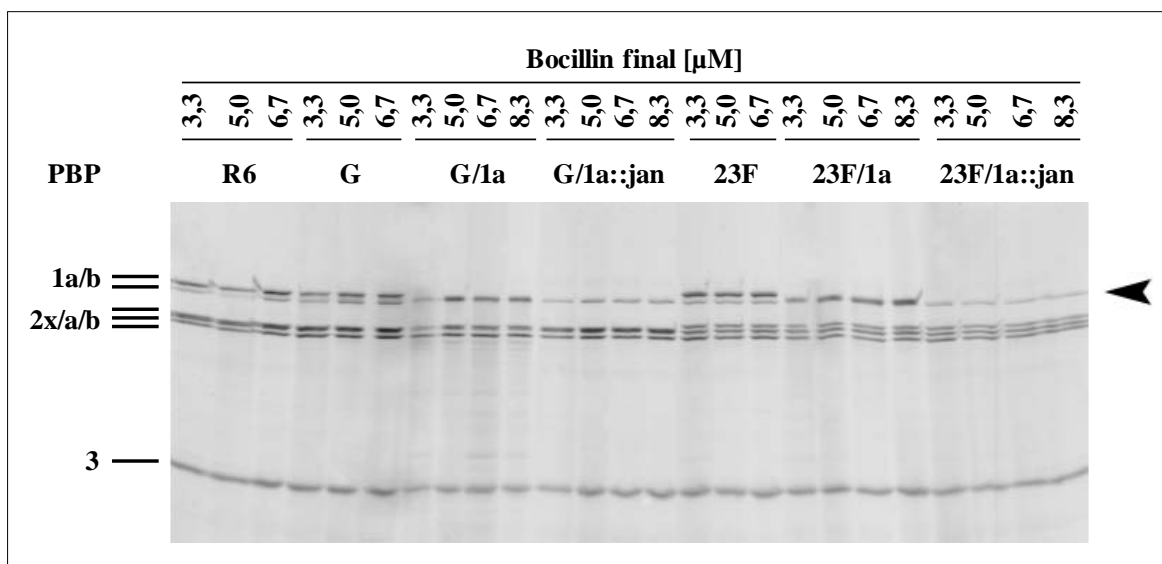


Abb. 3.9: PBP-Profil der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ -Transformante.

Gezeigt ist das PBP-Profil der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$, $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante und zum Vergleich von R6, der $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$ und $R6_{pbp2x2349}$ -Transformante. Zellysate der Mutanten und von R6 wurden für 30 min bei 37 °C mit 3,3, 5,0, 6,7 und 8,3 μM BocillinTM FL (final) inkubiert und die Bocillin-PBP-Komplexe nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8 mittels Fluorographie visualisiert. Die Striche auf der linken Seite markieren die Laufhöhe der jeweiligen PBP, die Pfeilspitze speziell die Lage von PBP1a. Spuren: R6; G: $R6_{pbp2xT338G}$; G/1a: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$; G/1a::jan: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$; 23F: $R6_{pbp2x2349}$; 23F/1a: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$; 23F/1a::jan: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$.

Da auch eine verminderte PBP2x-Menge in der Zelle für den Resistenzphänotyp verantwortlich sein konnte, wurde zusätzlich die Menge dieses Proteins angeschaut. Sowohl die Sequenz- als auch die SDS-PAGE- bzw. Western-Blotting-Analyse ließen jedoch keinen Unterschied zum Wildtyp R6 erkennen (Abb. 3.9 und Abb. 3.10 A, B). Wie erwartet, war in den beiden *pbp1a*-Inaktivierungsmutanten die PBP1a-Bande nicht mehr detektierbar. Nebenbei konnte ein verändertes Laufverhalten des PBP1a und PBP2x in den Transformanten mit dem 2349-*pbp1a* und -*pbp2x* festgestellt werden.

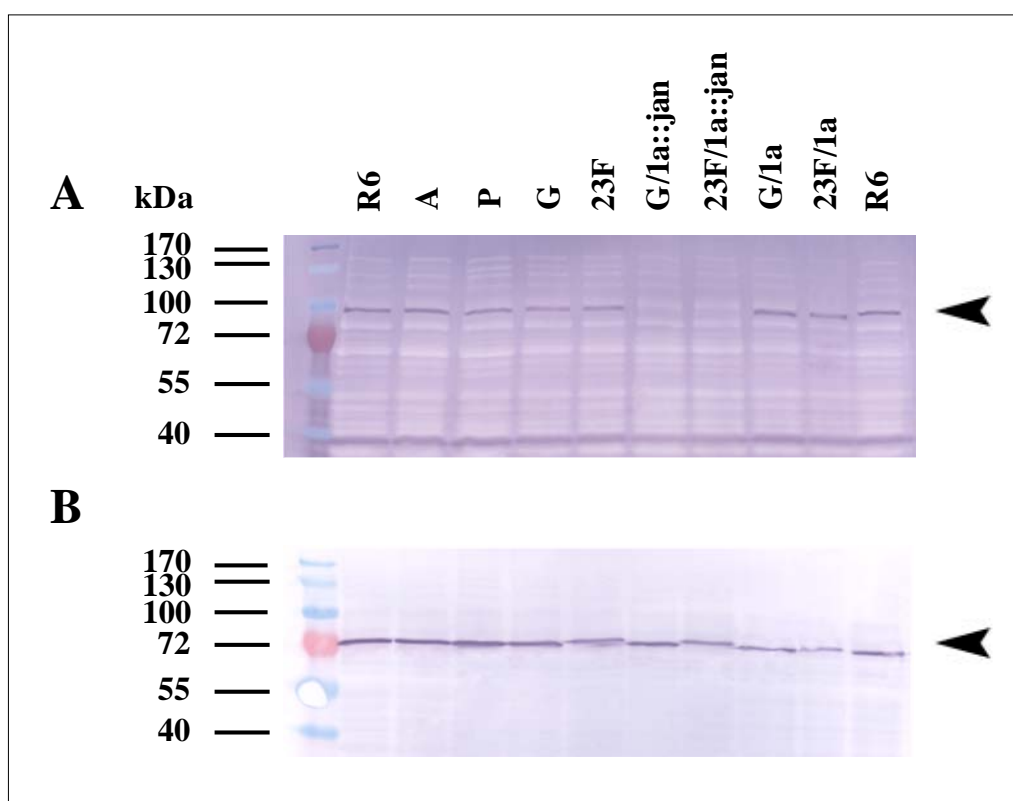


Abb. 3.10: PBP1a und PBP2x in der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349-}$ -Transformante.

Gezeigt ist eine PVDF-Membran mit dem durch Western-Blotting detektierten PBP1a (A) bzw. PBP2x (B) der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$, $R6_{pbp2xT338G-}$ -Mutante und zum Vergleich von R6, der $R6_{pbp2xT338A-}$, $R6_{pbp2xT338P-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$ und $R6_{pbp2x2349-}$ -Mutante. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE in einem 11 %igen SDS-Gel mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8 wurden diese durch ElektrobloTTing auf die Membran transferiert und PBP1a bzw. PBP2x über eine Antigen-Antikörperreaktion mit einem polyklonalen Antiserum gegen PBP1a (anti-PBP1a 1220 K-S rabbit) (1:3000 in PBST) (Hakenbeck *et al.*, 1991) bzw. affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern (anti-PBP2x rabbit) (1:10 000 in PBST) (Maurer *et al.*, 2008) nachgewiesen. Die Molekulargewichte des Molekulargewichtstandards sind jeweils auf der linken Seite angegeben; die Pfeilspitze kennzeichnet die Lage des visualisierten PBP1a (A) bzw. PBP2x (B). Zu beachten ist hierbei die geringfügig veränderte elektrophoretische Mobilität des Mosaik-PBP1a und -PBP2x der $R6_{pbp2x2349-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$ -Transformante. (A) und (B), Spuren: 1: Molekulargewichtstandard (peqGOLD Protein-Marker IV Prestained); R6; A: $R6_{pbp2xT338A}$; P: $R6_{pbp2xT338P}$; G: $R6_{pbp2xT338G}$; 23F: $R6_{pbp2x2349}$; G/1a::jan: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$; 23F/1a::jan: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$; G/1a: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349-}$; 23F/1a: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$.

3.1.4 Eine Thr338-Punktmutation in Kombination mit einem nichtfunktionellen Zwei-Komponenten-System CiaRH

Resistente klinische *S. pneumoniae*-Isolate, aber auch -Mutanten mit niederaffinen PBP2x scheinen offenbar keine Nachteile von der erworbenen Resistenz zu haben, sondern zeigen zumindest unter Laborbedingungen ein normales Wachstumsverhalten und auf den ersten Blick auch keinerlei Auffälligkeiten in ihrem morphologischen Erscheinungsbild. Wie sich nun aber herausstellte, resultiert eine Inaktivierung des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH in Kombination mit bestimmten PBP2x-Mutationen in gravierenden Wachstumsdefekten und morphologischen Aberrationen (Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Offensichtlich sind PBP2x-Mutationen funktionell nicht neutral, sodass die Zelle in ihrer Anwesenheit ein intaktes, möglicherweise kompensierendes CiaRH-System benötigt, um einen halbwegs stabilen physiologischen Zustand aufrechtzuerhalten. Daher sollte auch für eine Punktmutation an Position 338 im PBP2x untersucht werden, ob eine Inaktivierung von CiaRH einen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins bzw. Zellintegrität hat.

3.1.4.1 Inaktivierung von *ciaR* in den R6_{pbp2xT338}-Mutanten

Im Rahmen der Dissertation von Dorothea Zähler erfolgte die Integration einer Kasette mit dem Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* des Plasmids pDL278 aus *Enterococcus faecalis* (LeBlanc *et al.*, 1991) in das Gen für den RR CiaR des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH von *S. pneumoniae* R6 (Mascher *et al.*, 2003; Zähler, 1999). Das derart konstruierte *ciaR*-Inaktivierungsderivat R6_{ciaR::aad9} verfügt über ein nichtfunktionelles CiaRH-System, da *ciaR* unterbrochen ist und aufgrund der Operonstruktur von *ciaR* und *ciaH* beide Gene nicht mehr transkribiert bzw. translatiert werden können. Für die Inaktivierung von *ciaR* in den R6_{pbp2xT338}-Mutanten wurden diese mit einem 2225 bp großen Fragment der *ciaR::aad9*-Region aus R6_{ciaR::aad9} transformiert (siehe 2.7.3.4). Zur Untersuchung des Effekts der *ciaR*-Inaktivierung auf das Wachstum wurde im Folgenden jeweils eine der R6_{pbp2xT338AciaR::aad9}⁻, R6_{pbp2xT338PciaR::aad9}⁻ und R6_{pbp2xT338GciaR::aad9}⁻-Mutanten herangezogen. Die Ausgangsmutanten R6_{pbp2xT338A}, R6_{pbp2xT338P} und R6_{pbp2xT338G} zeigten in C-Medium nur eine geringfügige Beeinträchtigung ihres Wachstums (Abb. 3.11 und Tab. 3.2). Die Generationszeit von 30 bis 32 min war im Vergleich zu R6 (29 min) leicht erhöht. Zudem erreichten die Kulturen eine geringere maximale Zelldichte (113-128 N), verglichen mit R6 (130 N) und die Dauer der stationären Phase verkürzte sich von 5 ½ auf 4 ½-5 h. Ähnlich wie bei der β -Laktam-Resistenz ergab sich auch hier für die R6_{pbp2xT338G}-Mutante der größte Effekt. Wurde nun aber *ciaR* in diesen Mutanten inaktiviert, so hatte das dramatische Auswirkungen auf das Wachstum (Abb. 3.11 und Tab. 3.2).

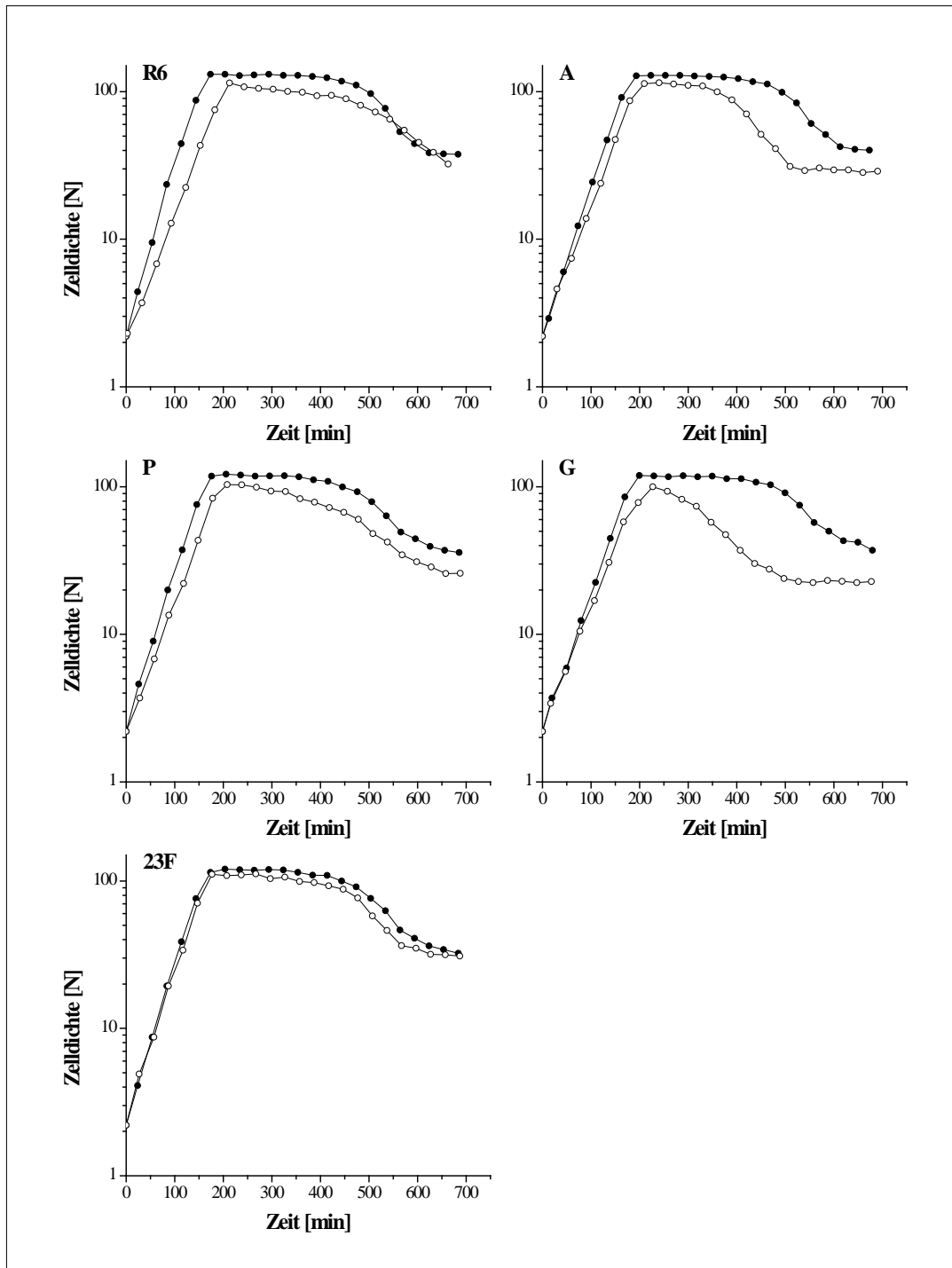


Abb. 3.11: Wachstum der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Dargestellt ist das Wachstum der $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten und zum Vergleich von $R6$, der $R6_{ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9^-}$ und $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.2 aufgeführten Daten. Die Zellichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise repräsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise die jeweiligen *ciaR*-Inaktivierungsderivate. Diagramme: R6; A: $R6_{pbp2xT338A}$; P: $R6_{pbp2xT338P}$; G: $R6_{pbp2xT338G}$; 23F: $R6_{pbp2x2349}$.

In allen drei $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -Mutanten führte die Unterbrechung von *ciaR* zu einer erhöhten Generationszeit, verminderten finalen Zelldichte und verkürzten bzw. fehlenden stationären Phase, begleitet von einer frühen Autolyse. Dabei präsentierten sich diese Wachstumsdefekte, abhängig von der jeweiligen Punktmutation im PBP2x, in einem unterschiedlichen Ausmaß. Während $R6_{pbp2xT338GciaR::aad9}$ mit einer Generationszeit von 38 min, einer maximalen Nephelo von 101 und einer stationären Phase von 1 h Dauer im Vergleich zu der Parentalmutante $R6_{pbp2xT338G}$ (32 min, 113 N, 4 ½ h) und R6 (29 min, 130 N, 5 ½ h) die stärkste Beeinträchtigung aufwies, schien das Wachstum von $R6_{pbp2xT338AciaR::aad9}$ und $R6_{pbp2xT338PciaR::aad9}$ weniger stark betroffen zu sein. Hierbei war auffällig, dass $R6_{pbp2xT338AciaR::aad9}$ schneller lysierte als $R6_{pbp2xT338PciaR::aad9}$, jedoch eine wesentlich höhere Dichte erlangte. Letztere Mutante ließ zwar eine früh einsetzende, aber dafür langsame und lang anhaltende Lyse erkennen. Die $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9}$ -Transformante, welche das bereits mehrfach erwähnte Mosaik-*pbp2x* von 2349 in Kombination mit der *ciaR*-Unterbrechung besitzt und zu Vergleichszwecken hinzugezogen wurde, zeigte hingegen ein fast normales Wachstumsverhalten mit einer, verglichen mit $R6_{pbp2x2349}$ und R6, etwas schnelleren Autolyse (Abb. 3.11 und Tab. 3.2). Die Präsenz eines nichtfunktionellen CiaRH-Systems im Wildtyp R6 brachte ebenfalls nahezu keine Einschränkungen im Wachstum mit sich, wobei hier je nach Zusammensetzung des C-Mediums die Lyse aber auch früher einsetzen konnte (Abb. 3.11 und Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Daten zum Wachstum der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase der $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -, $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten und zum Vergleich von R6, der $R6_{ciaR::aad9}$ -, $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9}$ - und $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus vier unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	29	130	5,5
$R6_{pbp2xT338A}$	31	128	5,0
$R6_{pbp2xT338P}$	30	122	5,0
$R6_{pbp2xT338G}$	32	113	4,5
$R6_{pbp2x2349}$	29	122	5,0
$R6_{ciaR::aad9}$	32	121	4,0
$R6_{pbp2xT338AciaR::aad9}$	33	120	3,0
$R6_{pbp2xT338PciaR::aad9}$	35	109	2,0
$R6_{pbp2xT338GciaR::aad9}$	38	101	1,0
$R6_{pbp2x2349ciaR::aad9}$	30	115	4,0

Wie sich bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung der Stämme in C-Medium unter Zusatz von 2 % Cholinchlorid herausstellte (siehe 2.6.4.1), war die Morphologie der Zellen ebenfalls beeinträchtigt. Die $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten wuchsen in langen, leicht verdrehten Ketten mit einzeln unregelmäßig geformten Zellen, im Gegensatz zu R6, der lange, ausgestreckte Ketten mit gleichmäßig geformten Zellen bildete. In Abwesenheit eines funktionellen *CiaRH*-Systems verstärkten sich diese morphologischen Aberrationen in den $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -Mutanten wesentlich; die Ketten enthielten einen größeren Anteil an mißgebildeten Zellen und es kam zu einer Verklumpung bzw. Knäuelbildung der Ketten. Die $R6_{ciaR::aad9}$ -Mutante wies hingegen kaum morphologische Defekte auf (nicht gezeigt).

Mithilfe des LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits (siehe 2.6.4.2) konnte auch eine starke Beeinträchtigung der Vitalität der $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -Derivate in C-Medium mit 2 % Cholinchlorid fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Abb. 3.12). Deren Ketten verfügten, verglichen mit denen von $R6_{ciaR::aad9}$, über einen hohen Prozentsatz an letal geschädigten Zellen, wobei bereits in den Ausgangsmutanten im Vergleich zu R6 vermehrt tote Zellen auftraten. Ein Vergleich der $R6_{pbp2xT338}$ - und $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -Mutanten in der früh- und mid- bzw. spät-exponentiellen Wachstumsphase erbrachte, dass die Kettenlänge, Anzahl an toten Zellen, sowie die Neigung zur Kettenverklumpung mit steigender Nephelo zunahm, letztere beiden Effekte aber am stärksten in den *ciaR*-Inaktivierungsderivaten ausgeprägt waren und bereits zu einem früheren Zeitpunkt einsetzten als in den Ausgangsmutanten. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Befunden war auch hier das Ausmaß der Defekte von der jeweiligen Punktmutation an Position 338 im PBP2x abhängig und fand seinen Höhepunkt in der $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9}$ -Mutante.

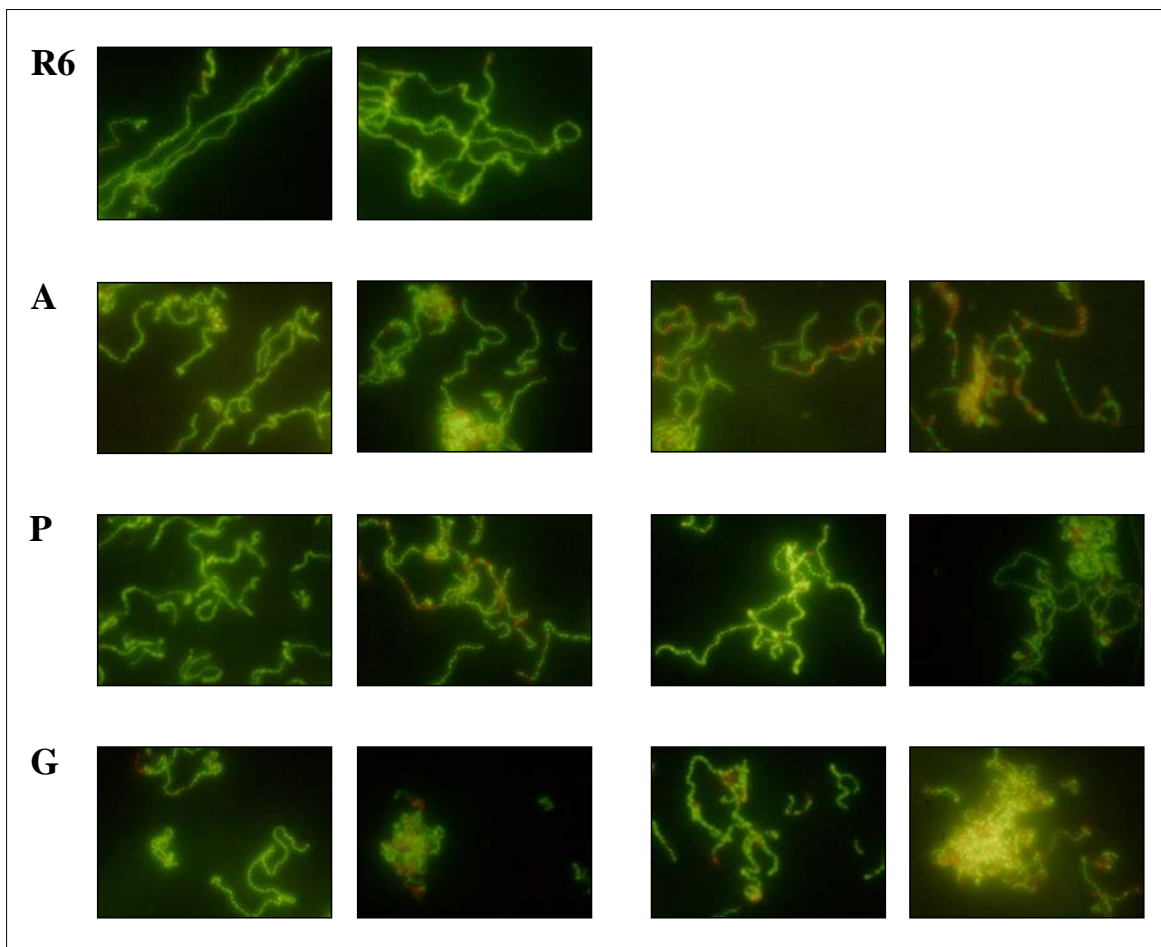


Abb. 3.12: Vitalität der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Gezeigt ist die Vitalität der $R6_{pbp2xT338ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten und zum Vergleich von R6 und der $R6_{ciaR::aad9^-}$ -Mutante. Kulturen wurden in C-Medium unter Zusatz von 2 % Cholinchlorid angezogen. Proben wurden in der früh- ($N \approx 20-30$) und mid- bzw. spätexponentiellen ($N \approx 50-60$) Wachstumsphase entnommen und mithilfe eines LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 100fachen Ölimmersionsobjektivs, zwei verschiedener Filtersätze und einer Kameraeinrichtung untersucht bzw. fotografiert. Lebende Zellen bzw. Zellen mit intakter Cytoplasmamembran fluoreszieren grün, tote Zellen bzw. Zellen mit geschädigter Cytoplasmamembran rot. Die gelbe Fluoreszenz resultiert aus der Überlagerung von mehreren lebenden und toten Zellen. Die beiden linken Bilder stellen jeweils den Ausgangstamm (links) und das entsprechende *ciaR*-Inaktivierungsderivat (rechts) in der früh-, die beiden rechten Bilder in der mid- bzw. spätexponentiellen Wachstumsphase dar. R6; A: $R6_{pbp2xT338A}$; P: $R6_{pbp2xT338P}$; G: $R6_{pbp2xT338G}$.

Die Inaktivierung von *ciaR* brachte keine signifikanten Veränderungen in der MHK der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten mit sich und wirkte sich auch nicht auf die PBP2x- und PBP1a-Menge in der Zelle aus (nicht gezeigt).

3.1.4.2 Inaktivierung von *ciaR* in der Mutante C303

In der Folge wurde eine weitere PBP2x-Mutante zum Vergleich herangezogen. Es handelte sich hierbei C303, einem Mitglied der C003-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten, welches neben einer auf der ersten Selektionsstufe (C103) auftretenden CiaH-Punktmutation (A203V), zwei

auf der zweiten (C203) und dritten (C303) hinzukommende Substitutionen in PBP2x (G597D und T550A) besitzen sollte (Abb. 3.13). Bei der Sequenzierung des *ciaH*-Gens der aus der Stammsammlung erhaltenen C303-Mutante stellte sich jedoch heraus, dass ein zusätzlicher Aminosäureaustausch an Position 360 in der KD von CiaH vorhanden war (D360Y) (Abb. 3.13). Es konnte schließlich eine C303-Mutante ausfindig gemacht werden, bei der diese Punktmutation noch nicht aufgetreten war. Beim Austesten unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen (Medium, Temperatur) fiel auf, dass das Auftreten dieser Mutation scheinbar durch Inkubation in C-Medium bei 30 °C statt bei 37 °C verhindert bzw. hinausgezögert werden kann. Da es aber für die meisten Experimente aus Vergleichsgründen erforderlich war, dass alle Stämme bei 37 °C angezogen wurden, konnte eine Inkubationstemperatur von 30 °C für C303 nicht eingehalten werden. Wie durch Sequenzierung bestätigt wurde, besitzt die in dieser Arbeit für alle Versuche eingesetzte C303-Mutante die zusätzliche Punktmutation in CiaH.

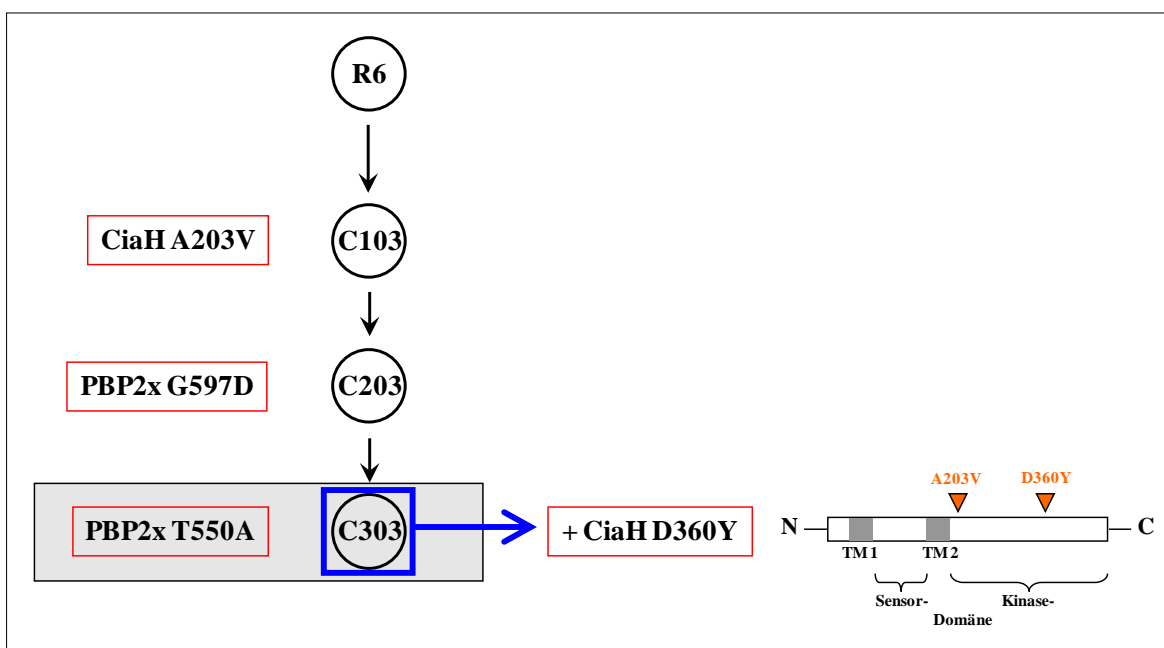


Abb. 3.13: Zusammensetzung der C003-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.

Dargestellt sind die ersten drei Mitglieder der C003-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten und die in ihnen identifizierten Mutationen. Ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Laborstamm R6 wurden unabhängige Familien von spontanresistenten Mutanten mit schrittweise steigenden Cefotaxim-Konzentrationen selektiert. Dabei ging diese Resistenzerhöhung mit einer Akkumulation von Punktmutationen einher, wobei in nahezu allen Fällen ein Selektionsschritt mit dem Auftreten einer Punktmutation in PBP2x oder CiaH korrelierte. Zudem kam es in jeder Familie ab einer bestimmten Stufe zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz. Zur Nomenklatur: C steht für Cefotaxim; die erste Ziffer gibt die Selektionsstufe, die letzte die Familie an. Die Kreise symbolisieren einzelne Mutanten, links daneben befindet sich rot umrandet die in der jeweiligen Mutante aufgetretene Mutation. Der graue Kasten verdeutlicht die in der C003-Familie ab der dritten Stufe zu beobachtende Kompetenzdefizienz. Die Mutante C303 wurde hervorgehoben, da sie Gegenstand der Untersuchungen war und in ihrem Genotyp durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Punktmutation in CiaH von der ursprünglich beschriebenen Mutante abwich. Diese zusätzliche Mutation sowie ihre Lage innerhalb von CiaH ist auf der rechten Seite angegeben.

Abk.: TM (Transmembran)

Die T550A-Mutation im PBP2x von C303 stellt insofern eine besondere Substitution dar, dass sie sowohl in Laborstämmen als auch in klinischen Isolaten auftritt und eine ungewöhnlich hohe Cefotaxim-Resistenz, aber gleichzeitige Hypersensitivität gegenüber Penicillinen vermittelt (Asahi *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991; McDougal *et al.*, 1995; Mouz *et al.*, 1999; Sifaoui *et al.*, 1996). Aus diesem Grund schien auch hier auf der Hand zu liegen, dass diese Punktmutation einen nicht ganz unbedeutenden Einfluss auf die Funktionalität von PBP2x und die Zellphysiologie ausüben könnte. Tatsächlich konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH sich gravierend auf die Zellintegrität von C303 auswirkt (Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006).

Zur Bestätigung dieser Resultate für die vom ursprünglichen Genotyp abweichende C303-Mutante (siehe oben) erfolgte in dieser Arbeit erneut die Herstellung einer *ciaR*-Inaktivierungsmutante von C303 durch Transformation dieses Stammes mit dem oben genannten *ciaR::aad9*-Konstrukt. Eine der erhaltenen Transformanten wurde einer Untersuchung des Wachstumsverhaltens in C-Medium unterzogen.

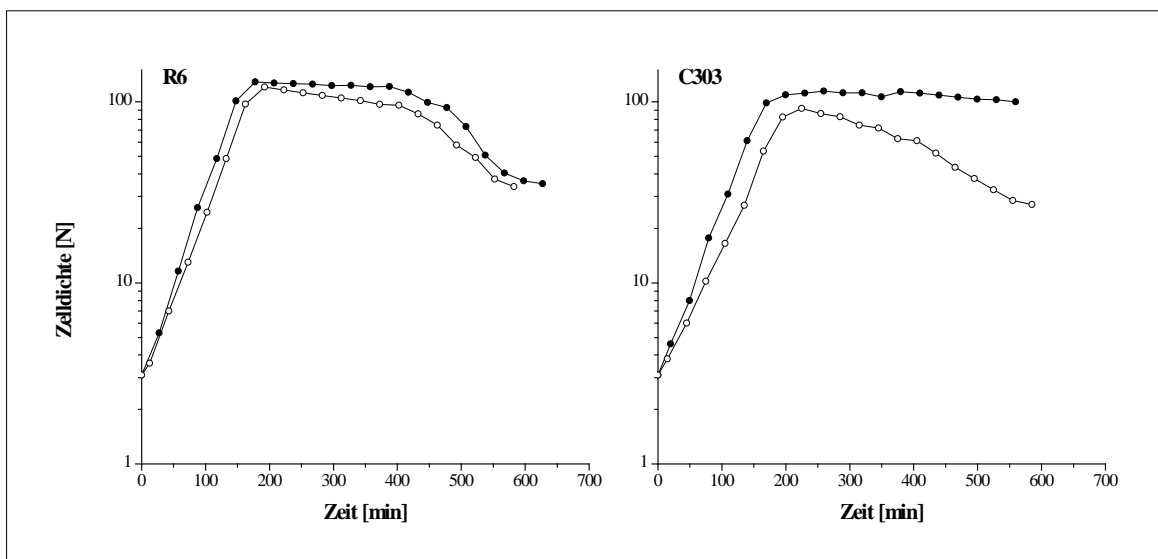


Abb. 3.14: Wachstum von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Dargestellt ist das Wachstum der C303_{*ciaR::aad9*}-Mutante, von C303 und zum Vergleich von R6 und der R6_{*ciaR::aad9*}-Mutante. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.3 aufgeführten Daten. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise repräsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise die jeweiligen *ciaR*-Inaktivierungsderivate.

Die Parentalmutante C303 hatte generell Schwierigkeiten anzuwachsen und erreichte mit 119 N auch eine geringere maximale Zelldichte als R6 (131 N) (Abb. 3.14 und Tab. 3.3). Dennoch konnte diese Mutante, wenn sie sich einmal in der exponentiellen Wachstumsphase befand, mit einer

Generationszeit von 31 min durchaus mit dem Wildtyp (30 min) mithalten und erbrachte dann sogar mit einer auffällig verlängerten stationären Phase (> 5 h) eine bessere Leistung als dieser (5 h). Eine Unterbrechung von *ciaR* in C303 hatte allerdings ähnlich dramatische Folgen wie in der R6_{*pbp2xT338GciaR::aad9*}-Mutante (siehe 3.1.4.1): Die Generationszeit erhöhte sich auf 38 min und die finale Zelldichte verringerte sich auf 95 N (Abb. 3.14 und Tab. 3.3). Die aber wohl einschneidendste Veränderung machte sich bei der stationären Wachstumsphase bemerkbar, die in der C303_{*ciaR::aad9*}-Mutante völlig fehlte. Hier setzte die Autolyse unmittelbar nach Erreichen der maximalen Nephelo ein.

Tab. 3.3: Daten zum Wachstum von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase der C303_{*ciaR::aad9*}-Mutante, von C303 und zum Vergleich von R6 und der R6_{*ciaR::aad9*}-Mutante zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus vier unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	30	131	5,0
C303	31	119	> 5,0
R6 _{<i>ciaR::aad9</i>}	32	126	3,5
C303 _{<i>ciaR::aad9</i>}	38	95	0

Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch bei der Zellmorphologie und -vitalität ab, für deren Analyse die Zellen in C-Medium mit 2 % Cholinchlorid unter Verwendung des LIVE/DEAD® *BacLight*[™] Bacterial Viability Kits (siehe 2.6.4.2) fluoreszenzmikroskopisch dargestellt wurden (Abb. 3.15). Während die Ausgangsmutante C303 in der frühexponentiellen Wachstumsphase überwiegend lange, meist ausgestreckte Ketten mit lebenden Zellen bildete, waren bei dem *ciaR*-Inaktivierungsderivat bereits in dieser Phase des Wachstums fast nur noch Kettenklumpen bzw. -knäuele mit deformierten und toten Zellen zu finden. Diese konnten in C303 erst in der mid- bzw. spätexponentiellen Wachstumsphase angetroffen werden.

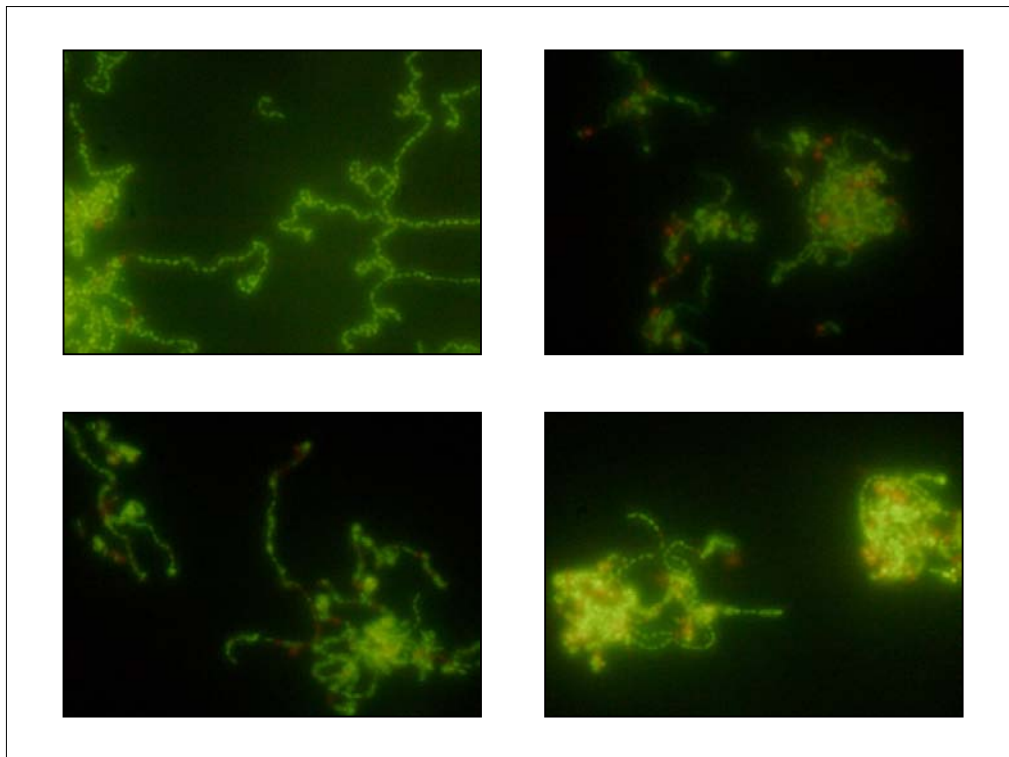


Abb. 3.15: Vitalität von C303 in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Gezeigt ist die Vitalität der C303_{*ciaR::aad9*}-Mutante und von C303. Kulturen wurden in C-Medium unter Zusatz von 2 % Cholinchlorid angezogen. Proben wurden in der früh- (N₃₀) und mid- bzw. spätexponentiellen (N₆₀) Wachstumsphase entnommen und mithilfe eines LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 100fachen Ölimmersionsobjektivs, zwei verschiedener Filtersätze und einer Kameraeinrichtung untersucht bzw. fotografiert. Lebende Zellen bzw. Zellen mit intakter Cytoplasmamembran fluoreszieren grün, tote Zellen bzw. Zellen mit geschädigter Cytoplasmamembran rot. Die gelbe Fluoreszenz resultiert aus der Überlagerung von mehreren lebenden und toten Zellen. Die linken Bilder stellen C303 in der früh- (oberes Bild) und mid- bzw. spätexponentiellen (unteres Bild) Wachstumsphase dar, die rechten Bilder die C303_{*ciaR::aad9*}-Mutante ebenfalls in diesen Phasen.

Darüber hinaus hatte die Anwesenheit eines nichtfunktionellen CiaRH-Systems auch Auswirkungen auf die Cefotaxim-MHK von C303, die etwa um das Zehnfache reduziert wurde. Dabei resultierte die Unterbrechung von *ciaR* nicht nur in einem vollständigen Verlust der durch das *ciaH*-Allel vermittelten Cefotaxim-Resistenz, sondern wie sich später herausstellte, auch in einem Rückgang der durch die zwei PBP2x-Mutationen hervorgerufenen Resistenz (siehe 3.1.5.1).

3.1.4.3 Auswirkungen der *ciaR*-Inaktivierung in der Mutante C303 auf die Zellwand-Zusammensetzung

Wie in den vorherigen Abschnitten aufgezeigt, sind PBP2x-Mutationen für die Zelle nicht ohne weiteres tolerierbar, da die Abwesenheit eines intakten CiaRH-Systems in Kombination zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums, der Zellmorphologie und der Lebensfähigkeit der Zellen führt. Da es sich bei PBP2x um ein Enzym handelt, welches in die Zellwandbiosynthese

involviert ist, wäre dementsprechend zu erwarten, dass ein funktionelles Defizit dieses Proteins sich in einer Veränderung der Zellwand-Zusammensetzung bemerkbar macht und diese Modifikation bei Anwesenheit eines funktionsfähigen CiaRH-Systems nicht präsent ist. Zur Überprüfung dieser Annahme erfolgte eine Analyse der Zellwand-Zusammensetzung im genetischen Hintergrund der C303-Mutante, da bei dieser die Auswirkungen einer *ciaR*-Inaktivierung besonders evident waren und somit auch mögliche Effekte deutlicher hervortreten sollten. Hierfür wurden R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und eine R6_{*pbp2x*C303}-Transformante in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid angezogen, die Zellwand präpariert und das Muropeptidprofil des Mureins und der Zellwand analysiert. Dabei diente R6 als Referenz, C103 bzw. R6_{*pbp2x*C303} zur Untersuchung des alleinigen Effekts des *ciaH*- bzw. *pbp2x*-Allels, C303 um mögliche kompensierende Mechanismen durch CiaRH aufzudecken und C303_{*ciaR::aad9*} zur Überprüfung, ob sich die bei der Zellmorphologie und -vitalität beobachteten Defekte auch in der Zellwandstruktur widerspiegeln. Die Zugabe von Cholinchlorid zum Medium erfolgte, um zelleigene Autolysine zu inhibieren und damit eine Autolyse, insbesondere eine verfrühte, wie sie bei der *ciaR*-Inaktivierungsmutante auftrat, zu verhindern. Somit konnte die Zellwandintegrität für die anschließende Analyse möglichst aufrechterhalten werden. Zudem sollte durch den Vergleich eines Ansatzes mit und ohne Cholinchlorid getestet werden, ob diese Substanz in dieser für die Zelle ungewöhnlich hohen Konzentration von 2 % irgendeinen unerwarteten Einfluss auf die Zellwandbiochemie ausübt.

Herstellung der R6_{*pbp2x*C303}-Transformante

Bei der routinemäßigen Sequenzierung des *pbp2x*-Gens der aus der Stammsammlung erhaltenen R6_{*pbp2x*C303}-Transformante zeigte sich, dass nur die T550A-Substitution im PBP2x dieser Transformante vorhanden war, der G597D-Austausch aber fehlte. Aus diesem Grund war es zunächst einmal erforderlich, ein R6-Derivat mit dem PBP2x von C303, also mit beiden Aminosäureaustauschen zu konstruieren. Das sollte sich, wie im Folgenden dargestellt wird, als nicht sehr einfach erweisen, und konnte nur über einen Umweg realisiert werden. Zur Herstellung der R6_{*pbp2x*C303}-Transformante diente das Plasmid pUC18 *pbp2x*C303 II/11, welches über ein 844 bp großes Fragment des *pbp2x* von C303 mit den für die zwei Aminosäuresubstitutionen T550A und G597D codierenden Codons verfügt. Der Stamm R6 wurde mit dem Plasmid transformiert und aufgrund der bereits für die vermeintlich richtige R6_{*pbp2x*C303}-Transformante bestimmten Cefotaxim-MHK von 0,2 µg/ml (Mascher, 2001) in einem Bereich von 0,14-0,24 µg/ml Cefotaxim selektioniert. Es konnten jedoch keine Kolonien erhalten werden, sodass die Selektionskonzentrationen in einem niedrigeren Bereich von 0,03-0,13 µg/ml Cefotaxim angesetzt wurden (Tab. 3.4). Daraufhin war auf allen Transformationsplatten eine hohe Anzahl an Kolonien zu verzeichnen, während die Negativkontrolle (siehe 2.6.6.2) kein Wachstum aufwies. Die Sequenzanalyse des *pbp2x* der bei allen Konzentrationen gepickten Klone ließ allerdings lediglich den T550A-Austausch im PBP2x dieser Transformanten erkennen. Eine weitere Transformation bei 30 statt bei

37 °C erbrachte ähnliche Resultate, sodass schließlich auf eine andere Strategie zurückgegriffen wurde. Hierzu wurde das Plasmid pUC18 pbp2xC203 III/11 herangezogen, das ein 637 bp großes Fragment des *pbp2x* der C303-Vorgängermutante C203 mit dem Codon für die G597D-Mutation enthält. Diese konnte in einer bei 30 °C durchgeführten Transformation erfolgreich in das *pbp2x* von R6 übertragen werden. Zur Insertion der T550A-Substitution wurde anschließend eine bei 0,04 µg/ml Cefotaxim gepickte und bei 30 °C kultivierte R6_{pbp2xC203}-Transformante (Tab. 3.4) mit dem Plasmid pUC18 pbp2xC303 II/11 transformiert. Hier wurden letztlich im *pbp2x* von mehreren, oberhalb von 0,09 µg/ml Cefotaxim gepickten Klonen die beiden gewünschten Mutationen identifiziert. Zur weiteren Untersuchung wurde eine R6_{pbp2xC303}-Transformante eingesetzt, welche bei 0,13 µg/ml Cefotaxim selektioniert wurde (Tab. 3.4). Angesichts der Tatsache, dass die Übertragung der zwei Punktmutationen nicht ganz unproblematisch verlief, wurde vermutet, dass der Besitz dieser beiden Substitutionen für die Zelle unvorteilhaft ist, und demnach eventuell gleichzeitig kompensatorische Mutationen in Genen wie *ciaH* aufgetreten sind. Durch eine Sequenzanalyse des *ciaH*-Gens der R6_{pbp2xC303}-Transformante konnte das aber ausgeschlossen werden.

Tab. 3.4: Selektion der R6_{pbp2xC303}-Transformante.

In der Tabelle sind die bei der Herstellung der R6_{pbp2xC303}-Transformante getesteten Rezipienten, transformierten Plasmide, Bedingungen, Cefotaxim-Selektionskonzentrationen und die dabei aus dem Transformationsansatz bzw. der Negativkontrolle jeweils hervorgegangene Anzahl an Kolonien aufgelistet. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert. Bei den rot markierten Selektionskonzentrationen und Anzahlen wurden Kolonien gepickt und analysiert. Die Negativkontrolle gibt die Anzahl der Kolonien aus einem Transformationsansatz ohne DNA unter selektiven Bedingungen (mit Antibiotikum) an.

Rezipient	transformierte DNA	Bedingung	Cefotaxim [µg/ml]	Transformanten [cfu/ml]	Negativkontrolle [cfu/ml]
R6	pUC18 pbp2xC303 II/11	37 °C	0,03-0,13	8,56 x 10⁵-1,84 x 10³	0
			≥ 0,14	0	0
		30 °C	0,03-0,07	2,2 x 10⁵-3,38 x 10⁴	0
			≥ 0,11	0	0
R6	pUC18 pbp2xC203 III/11	30 °C	0,03-0,06	1,0 x 10⁵-2,0 x 10¹	0
			≥ 0,08	0	0
R6 _{pbp2xC203}	pUC18 pbp2xC303 II/11	37 °C	0,03-0,07	n.z.	n.z.-7,54 x 10 ⁶
			0,09-0,15	1,8 x 10⁵-1,15 x 10²	3,05 x 10³-0

Abk.: n.z. (nicht zählbar aufgrund von Bakterienrasen)

Wachstumsverhalten der Stämme R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid

Das Wachstumsverhalten von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und der R6_{pbp2xC303}-Transformante wurde in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid in Abb. 3.16 und Tab. 3.5 dokumentiert.

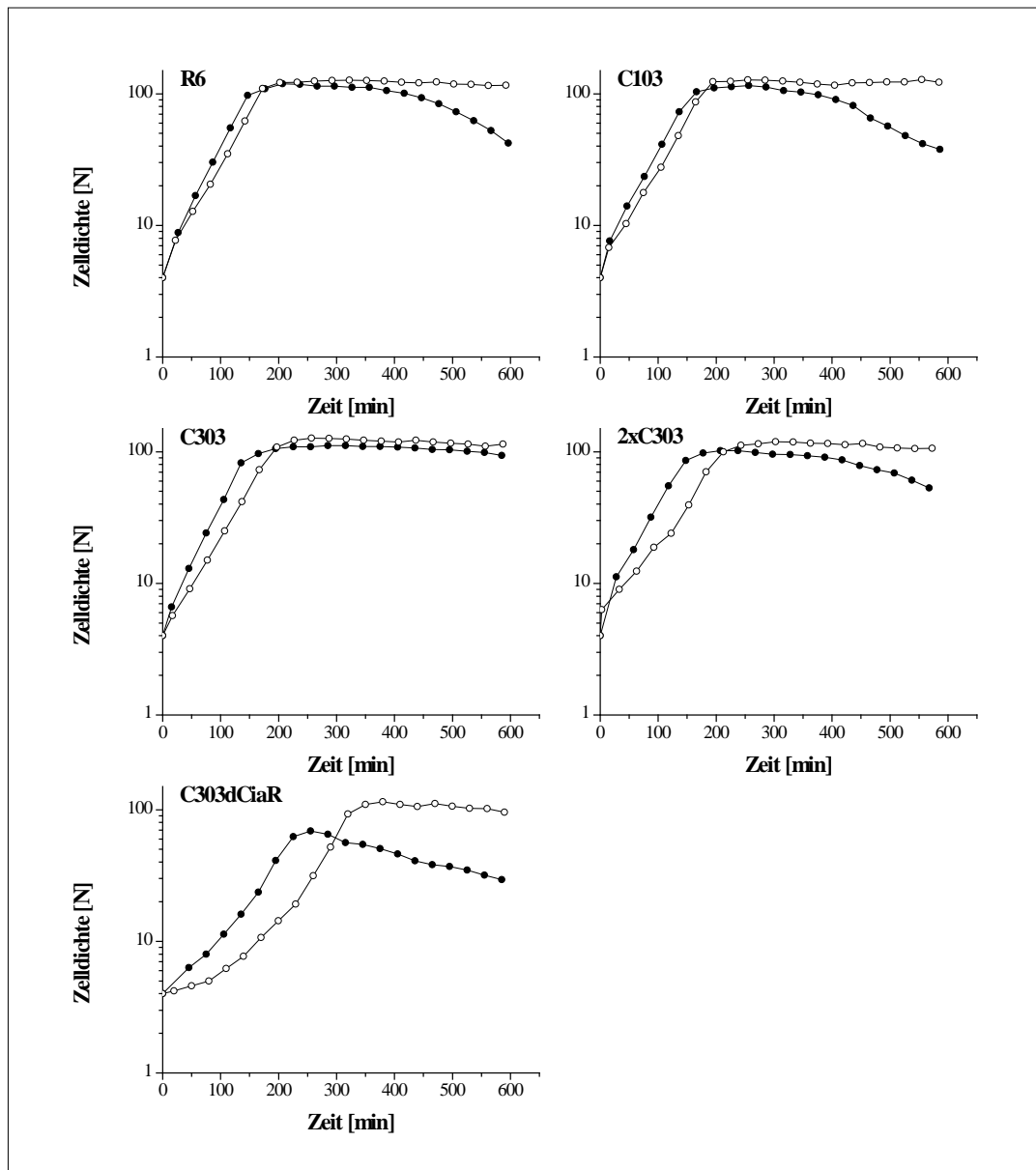


Abb. 3.16: Wachstum von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid.

Dargestellt ist das Wachstum von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.5 aufgeführten Daten. Die Zellichte ist in Nepheloeinheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise repräsentieren das Wachstum in Ab-, offene Kreise in Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid. Diagramme: R6; C103; C303; 2xC303: R6_{pbp2xC303}; C303dCiaR: C303_{ciaR::aad9}.

Die Stämme C103, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} zeigten in C-Medium ohne Zusatz von Cholinchlorid eine, verglichen mit dem Wildtyp (30 min, 121 N, 5 h), höhere Generationszeit (32-42 min), niedrigere maximale Zelldichte (70-113 N) und geringfügig kürzere (C103 und R6_{*pbp2xC303*}) (4 h) bzw. fehlende (C303_{*ciaR::aad9*}) stationäre Wachstumsphase, wobei diese Effekte am deutlichsten in R6_{*pbp2xC303*} und, wie erwartet, in dem *ciaR*-Inaktivierungsderivat von C303 in Erscheinung traten. Die Mutante C303 hingegen schien, wie bereits in 3.1.4.2 beschrieben, kaum Einbußen zu haben; im Gegenteil, ihr Wachstumsverhalten mit einer markant ausgeprägten stationären Phase (> 6 ½ h) war vergleichbar mit dem Wachstum in Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid. Diese erhöhte Konzentration führte bei allen Stämmen erwartungsgemäß zu einer Inhibition der Autolyse und demnach zu einer verlängerten stationären Wachstumsphase. Zudem erreichten alle Mutanten, jedoch nicht R6, eine höhere finale Zelldichte, was sich insbesondere bei C303_{*ciaR::aad9*} (70 → 103 N) und R6_{*pbp2xC303*} (100 → 111 N), aber eher weniger bei C303 (108 → 116 N) und C103 (113 → 115 N) bemerkbar machte. Gleichzeitig kam es zu einer drastischen Erhöhung der Generationszeit um etwa 10 min, sowohl in R6 als auch in den Mutanten.

Tab. 3.5: Daten zum Wachstum von R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase von R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} in C-Medium mit und ohne 2 % Cholinchlorid zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus drei unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	2 % Cholinchlorid	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	-	30	121	5,0
	+	40	115	> 6,0
C103	-	32	113	4,0
	+	41	115	> 6,0
C303	-	30	108	> 6,5
	+	41	116	> 5,5
C303 _{<i>ciaR::aad9</i>}	-	42	70	0
	+	51	103	> 4,0
R6 _{<i>pbp2xC303</i>}	-	35	100	4,0
	+	49	111	> 5,0

Eine parallel durchgeführte Messung der OD₆₀₀, die auch der späteren Dokumentation des Wachstums bei der Herstellung der Zellsuspension für die Zellwand-Analyse diente, bestätigte im Wesentlichen das beschriebene Wachstumsverhalten der Stämme (nicht gezeigt).

Zellwand-Analyse der Stämme R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303}

Bei der Analyse der Zellwand von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} konnte das Muropeptidprofil der Zellwand in An- und Abwesenheit von 2 % Cholinchlorid nur für Monomere in Chromatogrammen dargestellt werden. Die in den Zellwand-Proben noch enthaltenen WTAs führten vermutlich zu einem unvollständigen Muramidase-Verdau (siehe 2.8.3), was zur Folge hatte, dass nur die Monomere ohne gebundene TAs analysiert werden konnten, da die Dimere von TA-Peaks überlagert waren. Für das Muropeptidprofil des Mureins wurden Chromatogramme mit Monomeren, Dimeren und Trimeren erhalten, aber lediglich für das Wachstum ohne 2% Cholinchlorid (siehe Tab. 3.6 und Abb. 7.1, Abb. 7.2 im Anhang).

Tab. 3.6: Übersicht über die bei der Zellwand-Analyse von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} gewonnenen Muropeptidprofile.

In der Tabelle sind die aus der Zellwand-Analyse von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} hervorgegangenen Muropeptidprofile zusammengefasst. Ein + deutet auf das Vorhandensein des entsprechenden Profils hin, ein – auf sein Fehlen.

	Muropeptidprofil	
	Murein	Zellwand
- 2 % Cholinchlorid	+	+
+ 2 % Cholinchlorid	-	+
Monomere	+	+
Dimere	+	-
Trimere	+	-

Die Strukturen aller in den untersuchten Stämmen detektierten Monomer-, Dimer-, und Trimer-Muropeptide mit den jeweiligen Peaknummern sind in Abb. 7.3 im Anhang aufgeführt. Dabei repräsentieren Peak 4, 9, 13, 19, 21, 23, 26 (linke Struktur), 31 und 32 die Haupt-Disaccharid-Peptid-Untereinheiten der Pneumokokken-Zellwand. Die Quantifizierung der Muropeptide erfolgte durch Bestimmung der Peakflächen und Berechnung des relativen Anteils der einzelnen Komponenten am wiedergewonnenen Gesamtpeptidmaterial, wobei die entsprechenden Daten für jeden Stamm den Tab. 7.1 und Tab. 7.2 im Anhang zu entnehmen sind.

Bei Betrachtung der relativen Mengen an Muropeptiden für das Profil des Mureins (siehe Abb. 3.17 und Tab. 7.1 im Anhang) fiel auf, dass R6 und C103 durchgehend ähnliche Werte aufwiesen.

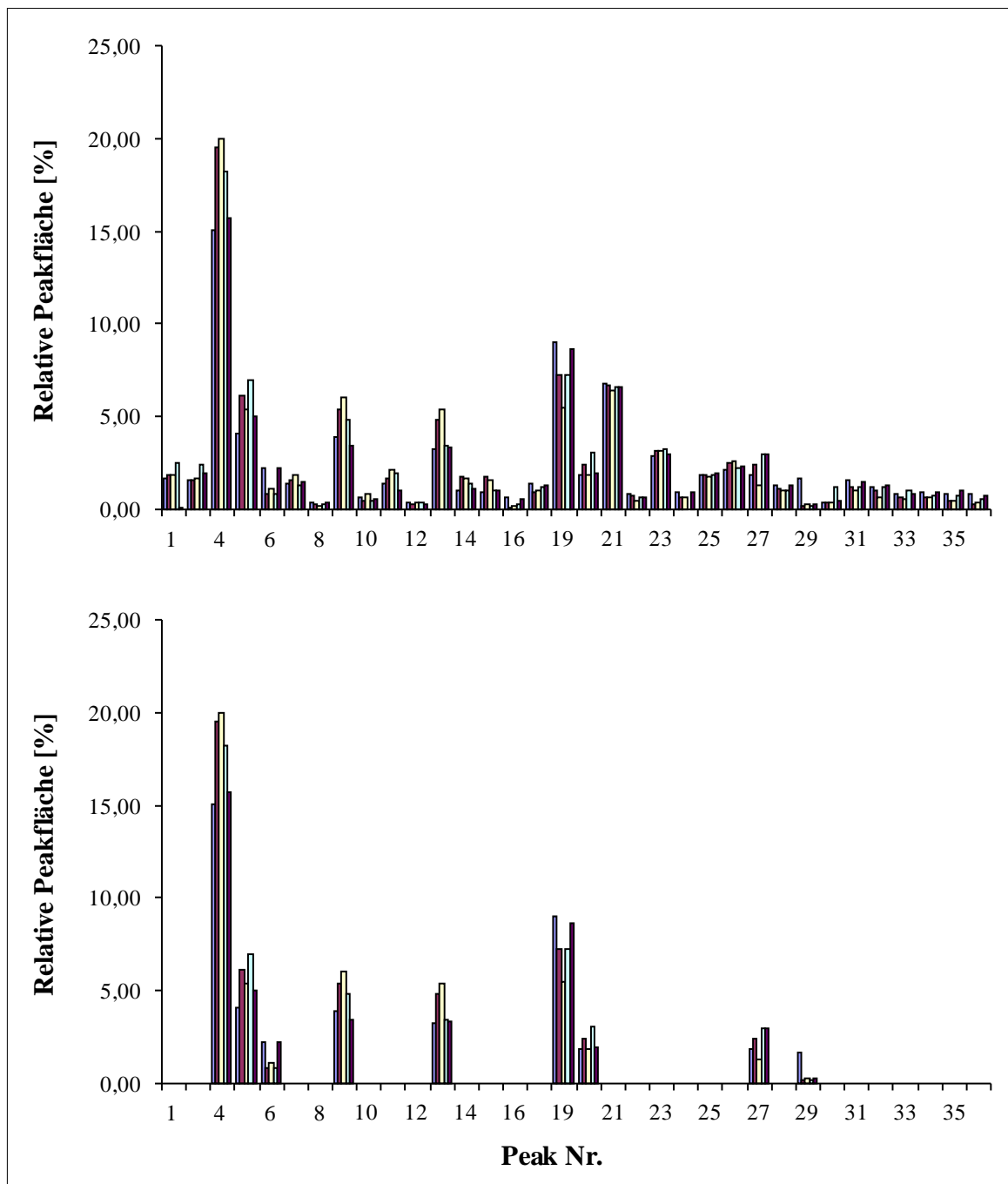


Abb. 3.17: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.

In den Diagrammen ist für die Stämme R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} die relative Fläche der einzelnen Peaks an der Gesamtpeakfläche (relativer Anteil der detektierten Muropeptide am Gesamtpeptidmaterial in Prozent) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein aufgezeigt. Das obere Diagramm zeigt alle Peaks; im unteren sind die signifikanten nochmal gesondert aufgeführt. Eine Generierung der Werte in Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid war nicht möglich. Die entsprechenden Zahlenwerte befinden sich in Tab. 7.1 im Anhang. Die Zahlen der Abszisse geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern) (siehe Abb. 7.1 im Anhang), wobei in Abb. 7.3 im Anhang den Zahlen Strukturen zugeordnet sind. Anzumerken ist, dass Peak 2 und 3, sowie 17 und 18 jeweils als ein Block dargestellt sind, da ihre Auftrennung nicht erzielt werden konnte. Erste Säule: R6; zweite Säule: R6_{pbp2xC303}; dritte Säule: C303; vierte Säule: C303_{ciaR::aad9}; fünfte Säule: C103.

Unter Festsetzung einer Grenze von größer gleich 1 % als signifikante Veränderung, waren hier bis auf Peak 1, 27 und 29, die ohnehin eine eher untergeordnete Rolle spielen, keine Unterschiede zu verzeichnen. Die *ciaR*-Inaktivierungsmutante legte hingegen bereits bei wesentlich mehr Werten eine Abweichung zum Wildtyp an den Tag; hier waren Peak 4, 5, 6, 9, 19, 20, 27 und 29 bezeichnend. Die gravierendsten Veränderungen aber traten immer dann auf, wenn das PBP2x von C303 mit den zwei Punktmutationen T550A und G597D in einem Stamm vorhanden war, also in C303, C303_{*ciaR::aad9*} und der R6_{*pbp2xC303*}-Transformante. Hier waren ausschließlich Haupt-Muropeptide der Pneumokokken-Zellwand betroffen (Peak 4, 6, 9 und 19). Ein Vergleich der Daten der R6_{*pbp2xC303*}-Transformante mit denen von C303_{*ciaR::aad9*} bzw. C303 erbrachte lediglich zwei signifikante Abweichungen (Peak 4 und 13 bzw. Peak 19 und 27) und ließ demnach keinen wesentlichen Effekt von CiaRH im Hinblick auf die PBP2x-Mutationen erkennen. Darüber hinaus trat Peak 29 hervor, bei dem R6 einen beträchtlich höheren Wert erzielte als die Mutanten. Im Ganzen erstreckten sich die Veränderungen im Bezug auf den Wildtyp auf sechs Muropeptide: Während die Tri (Peak 4), Penta (Peak 9) -Monomere und deacetylierten Tetra-Tri-Dimere mit einer Alanin-Alanin bzw. Serin-Alanin-Verzweigung (Peak 27) anstiegen, erfuhren die Tetra- bzw. Tri-Monomere mit einer Alanin-Verzweigung (Peak 6), Tetra-Tri- (Peak 19), Tetra-Penta-Dimere bzw. Tetra-Tetra-Tri-Trimere (Peak 29) eine Reduktion.

Für die Analyse des Muropeptidprofils der Zellwand in An- und Abwesenheit von 2 % Cholinchlorid ergab sich hingegen ein völlig anderes Bild (siehe Abb. 3.18 und Tab. 7.2 im Anhang). In Abwesenheit dieser erhöhten Konzentration im C-Medium konnten bis auf Peak 4 keine ausschlaggebenden Differenzen zwischen R6 und C103 festgestellt werden; in Anwesenheit stieg ihre Anzahl bereits auf vier: Peak 2/3, 4, 5 und 11. Ähnlich verhielt es sich mit C303_{*ciaR::aad9*}; auch hier konnten ohne 2 % Cholinchlorid keine wesentlich veränderten Werte zu R6 festgemacht werden, die Präsenz hingegen hatte durchschlagende Auswirkungen auf Peak 1, 4, 5, 6, 11, 13, 14 und 15. Ein Vergleich der Daten der PBP2x-Mutanten mit denen von R6 und C103 deckte einen entscheidenden Unterschied zu dem Muropeptidprofil des Mureins auf. Die dort durch das mutierte PBP2x verursachten Modifikationen in C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} verschwanden bei den Zellwand-Muropeptiden in Abwesenheit von 2 % Cholinchlorid bis auf Peak 6 vollständig. Bei Zusatz dieser Substanz zum Medium manifestierten sich ähnliche Veränderungen, die diesmal allerdings auch auf die C103-Mutante übergriffen, die nicht über ein solches PBP2x verfügte (Peak 4). Eine Gegenüberstellung aller Werte für R6_{*pbp2xC303*} und C303 bzw. C303_{*ciaR::aad9*} lieferte auch hier keinen greifbaren Zusammenhang zwischen dem mutierten PBP2x und CiaRH (Peak 5, 11 und 13 bzw. 5, 11, 13 und 14). Was R6 anbelangt, so waren lediglich bei Peak 4 und 11 Abweichungen zu den Mutanten zu finden.

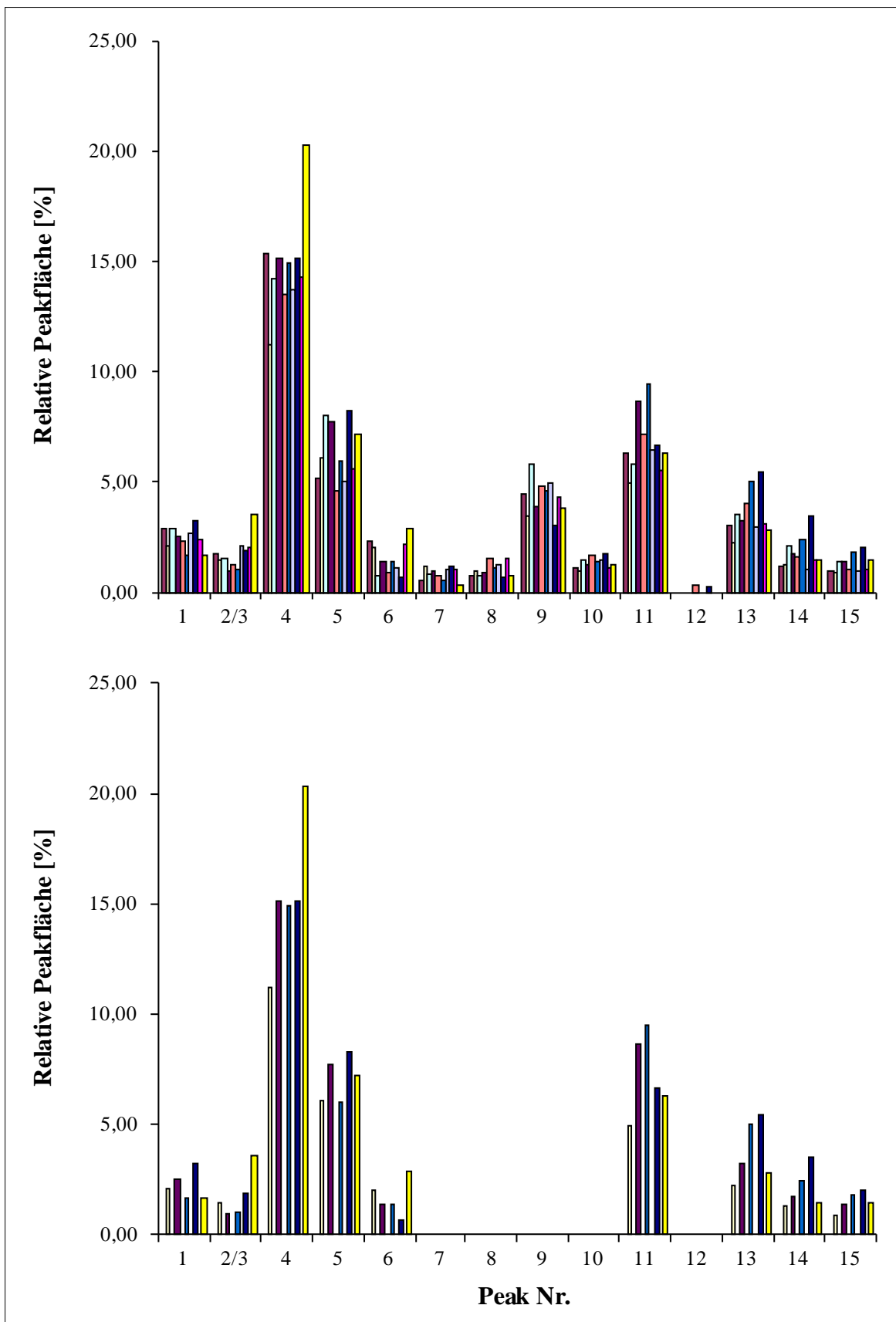


Abb. 3.18: Relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.

Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.18: Relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.

In den Diagrammen ist für die Stämme R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} die relative Fläche der einzelnen Peaks an der Gesamtpeakfläche (relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide am Gesamt-Monomerpeptidmaterial in Prozent) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid aufgezeigt. Das obere Diagramm zeigt alle Peaks; im unteren sind die signifikanten bei Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid nochmal gesondert aufgeführt. Eine Quantifizierung der Dimere und Trimere war nicht möglich. Die entsprechenden Zahlenwerte befinden sich in Tab. 7.2 im Anhang. Die Zahlen der Abszisse geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern) (siehe Abb. 7.2 A und B im Anhang), wobei in Abb. 7.3 im Anhang den Zahlen Strukturen zugeordnet sind. Anzumerken ist, dass Peak 2 und 3 als ein Block dargestellt sind, da ihre Auftrennung nicht erzielt werden konnte. Erste, dritte, fünfte, siebte, neunte Säule: R6, R6_{*pbp2xC303*}, C303, C303_{*ciaR::aad9*}, C103 ohne 2 % Cholinchlorid; zweite, vierte, sechste, achte, zehnte Säule: R6, R6_{*pbp2xC303*}, C303, C303_{*ciaR::aad9*}, C103 mit 2 % Cholinchlorid.

Bei der Nebeneinanderstellung der Daten mit und ohne 2 % Cholinchlorid für jeden Stamm stellte sich heraus, dass die meisten und wesentlichen Unterschiede in der *ciaR*-Inaktivierungsmutante auftraten, der Wildtyp aber auch betroffen war. Insgesamt präsentierten sich charakteristische Änderungen bezüglich R6 bei sechs Muropeptiden: Den Tri (Peak 4), deacetylierten Tri (Peak 5), Tri mit einer Alanin-Verzweigung bzw. Tetra (Peak 6) und verschiedenen Tri mit einer Serin-Alanin-Verzweigung (Peak 11, 13 und 14) -Monomeren, wobei keine eindeutige Richtung erkennbar war. Überraschenderweise handelte es sich hierbei bis auf die Strukturen 4, 5 und 6 um ganz andere Muropeptide als diejenigen, die bei dem Profil des Mureins als signifikant in Erscheinung getreten waren. Zudem fielen erstaunlich viele deacetylierte Strukturen und ausschließlich Tri-Monomere darunter.

Um einen Überblick über die Veränderungen im Gesamten zu erhalten, wurden für jeden Stamm alle Monomere, Dimere, Trimere zusammengefasst und die entsprechenden Summen auf die Peakfläche aller bzw. nur der bekannten Peaks des jeweiligen Muropeptidprofils bezogen. Durch die Zusammenfassung der Daten für das Murein-Profil wurde der bereits oben erwähnte Befund, dass immer dann signifikante Veränderungen auftraten, wenn das mutierten PBP2x vorlag, noch deutlicher (Abb. 3.19 oben). Zugleich zeigte sich auch, dass diese fast ausschließlich die Monomere betrafen, wohingegen die Dimere und Trimere eher weniger beeinflusst schienen. So kam es zu einem markanten Anstieg sowohl der linearen als auch verzweigten Monomere in C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*}, während die verzweigten Dimere in ihrer Anzahl annähernd konstant blieben und nur bei den linearen Dimeren und Trimeren ein Abfall zu beobachten war. Dabei ließ C303 den stärksten, die *ciaR*-Inaktivierungsmutante den schwächsten Effekt erkennen. Die Stämme R6 und C103 wiesen durchweg fast identische Werte auf.

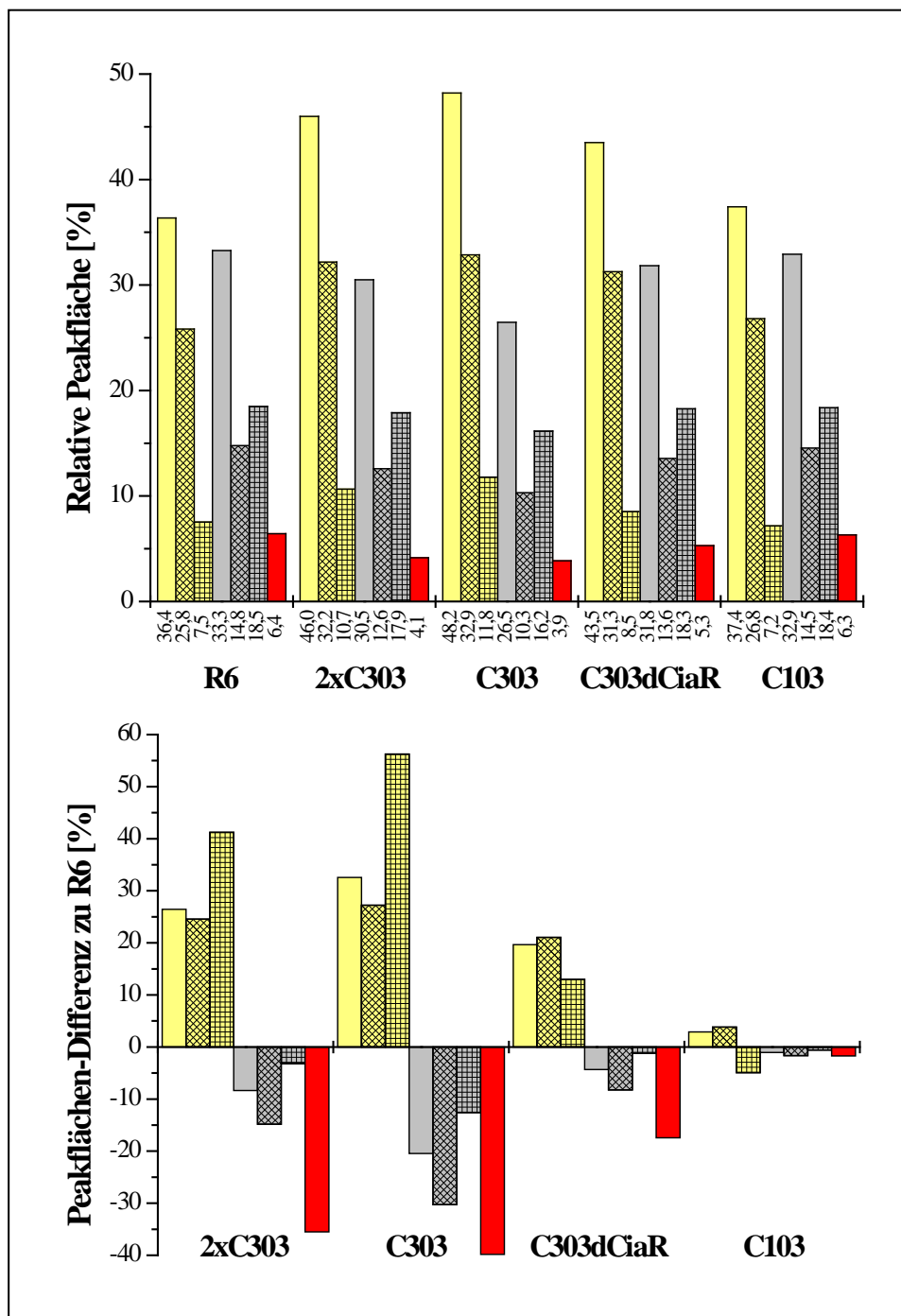


Abb. 3.19: Relativer Anteil der zusammengefassten monomeren, dimeren und trimeren Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.

Die Diagramme zeigen für die Stämme R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} die relative Fläche der nach monomeren, dimeren und trimeren Muropeptiden zusammengefassten Peaks an der Gesamtpeakfläche (relativer Anteil der zusammengefassten monomeren, dimeren und trimeren Muropeptide am Gesamtpeptidmaterial in Prozent) (oben) sowie die Differenzen dieser Werte zwischen den untersuchten Mutanten und R6 (unten) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein. Eine Generierung der Werte in Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid war nicht möglich. Die entsprechenden Zahlenwerte befinden sich unterhalb der Abszisse. Gelbe Säulen kennzeichnen monomere, graue Säulen dimere und rote Säulen trimere Muropeptide. Säulen ohne Schraffur geben die Summe der jeweiligen Muropeptid-Art an, Säulen mit rautierter Schraffur lineare Strukturen und Säulen mit kariierter Schraffur verzweigte Strukturen. Säulen-Gruppen: R6; 2xC303: R6_{*pbp2xC303*}; C303; C303dCiaR: C303_{*ciaR::aad9*}; C103.

Die Daten des Muropeptidprofils der Zellwand ohne 2 % Cholinchlorid bestätigten ebenfalls die oben gemachte Feststellung, dass die durch das mutierte PBP2x hervorgerufenen Auswirkungen hier vollständig aufgehoben waren (Abb. 3.20 A, B oben). Bis auf eine leichte Erhöhung der verzweigten Monomere in C303 und der $R6_{pbp2xC303}$ -Transformante konnten keine Divergenzen zwischen den einzelnen Stämmen identifiziert werden.

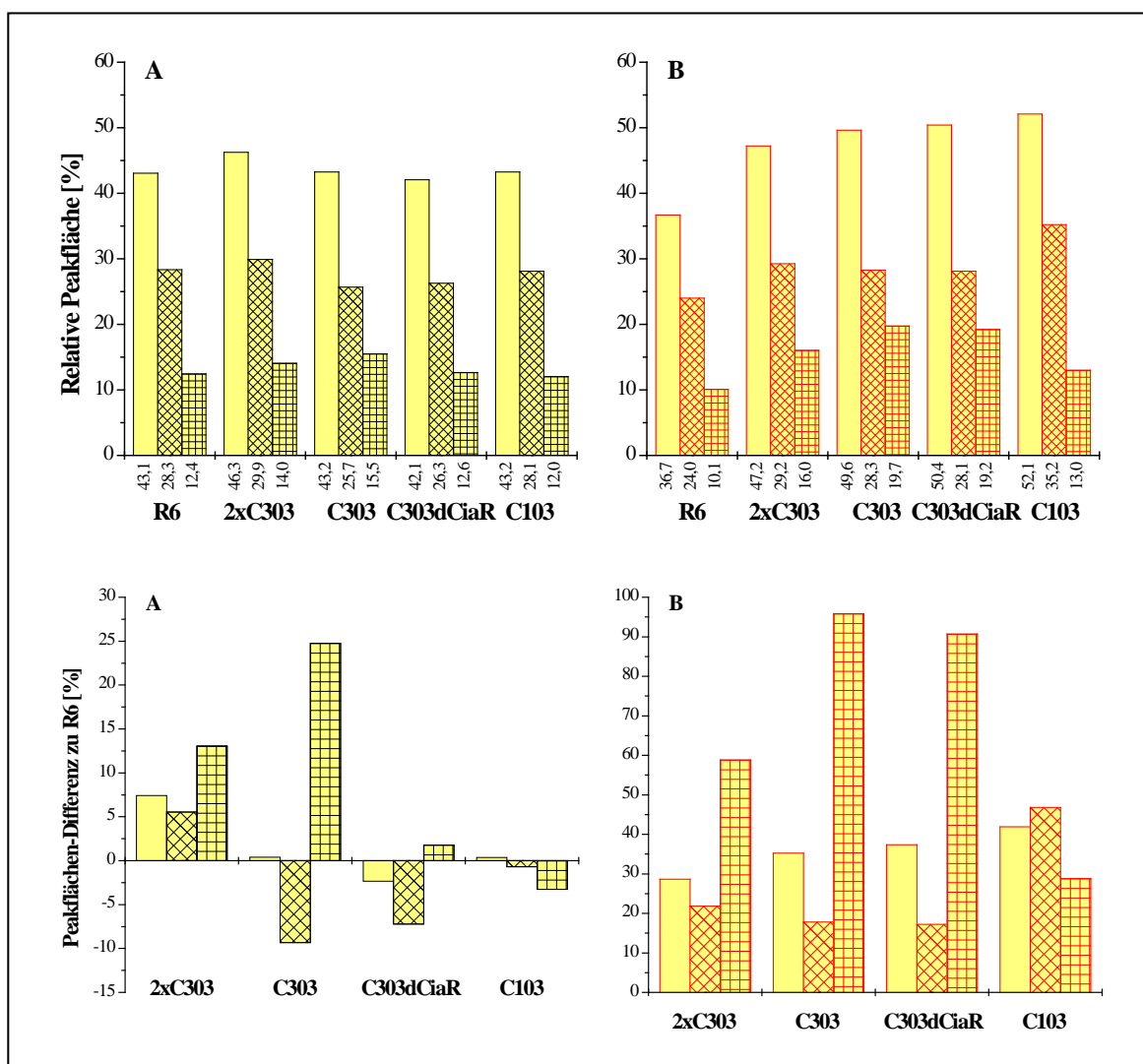


Abb. 3.20: Relativer Anteil der zusammengefassten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.

Die Diagramme zeigen für die Stämme R6, C103, C303, $C303_{ciaR::aad9}$ und $R6_{pbp2xC303}$ die relative Fläche der nach monomeren Muropeptiden zusammengefassten Peaks an der Gesamtpeakfläche (relativer Anteil der zusammengefassten monomeren Muropeptide am Gesamt-Monomerpeptidmaterial in Prozent) (oben) sowie die Differenzen dieser Werte zwischen den untersuchten Mutanten und R6 (unten) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- (A) Anwesenheit (B) von 2 % Cholinchlorid. Eine Quantifizierung der Dimere und Trimere war nicht möglich. Die entsprechenden Zahlenwerte befinden sich unterhalb der Abszisse. Säulen ohne Schraffur geben die Summe der Monomere an, Säulen mit rautierter Schraffur lineare Monomere und Säulen mit kariierter Schraffur verzweigte Monomere. Säulen-Gruppen: R6; 2xC303: $R6_{pbp2xC303}$; C303; C303dCiaR: $C303_{ciaR::aad9}$; C103

Auch die Ergebnisse mit 2 % Cholinchlorid stützten die bereits dargelegte Beobachtung, dass der Zusatz dieser Substanz einen Anstieg der Monomere, wie er in dem Murein-Muropeptidprofil der PBP2x-Mutanten zu erkennen war, hervorrief. Dieser äußerte sich allerdings in allen Mutanten und fand seine stärkste Ausprägung sogar in C103. Ein wesentlicher Unterschied hierbei bestand auch darin, dass bei den Stämmen mit PBP2x_{C303} sowohl eine Steigerung der linearen als auch verzweigten Monomere sichtbar wurde, bei der C103-Mutante der größte Teil des Zugewinns an Monomeren jedoch von linearen herrührte und die verzweigten eher unberührt blieben.

Ein Einfluss des CiaRH-Systems konnte bis auf die Verstärkung des durch das PBP2x mit den zwei Punktmutationen bewirkten Effekts im Murein-Muropeptidprofil der C303-Mutante in keinem der Profile detektiert werden. Alle oben beschriebenen Resultate wurden durch die auf die nur bekannten Peaks bezogenen Berechnungen (nicht gezeigt) und Differenzen zwischen den Werten der Mutanten und denen von R6 (Abb. 3.19 und Abb. 3.20 A, B unten) bekräftigt bzw. kamen noch deutlicher zum Ausdruck.

3.1.4.4 Inaktivierung von *ciaR* in der R6_{pbp2xT338G}- und R6_{pbp2x2349}-Mutante in Kombination mit verschiedenen *pbp1a*-Allelen

Die in 3.1.3 dargelegten Befunde deuten auf einen möglicherweise funktionellen Zusammenhang zwischen PBP2x und PBP1a hin. Diese Annahme lenkte das Interesse auf die Frage nach dem Effekt verschiedener *pbp1a*-Allele im genetischen Hintergrund einer PBP2x-Punktmutante bzw. Mosaiktransformante und einem nichtfunktionellen Zwei-Komponenten-System CiaRH.

Zur Klärung dieser Frage wurde die R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349⁻}, R6_{pbp2x2349pbp1a2349⁻}, R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL⁺} und R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL⁻}-Mutante mit dem in 3.1.4.1 dargestellten *ciaR::aad9*-Konstrukt transformiert und das Wachstumsverhalten in C-Medium untersucht. Überraschenderweise kam es durch die Gegenwart des Mosaik-PBP1a zur Aufhebung des in der R6_{pbp2xT338GciaR::aad9⁻}-Mutante beobachteten stark beeinträchtigten Wachstums (Abb. 3.21 und Tab. 3.7). Die Mutante R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9} zeigte bis auf eine nur noch geringfügig ausgeprägte Tendenz zur verfrühten Lyse ein normales Wachstumsverhalten. Bemerkenswert dabei war, dass verglichen mit R6_{pbp2xT338GciaR::aad9} keine Änderung in der Generationszeit (38 min) auftrat, sondern nur die maximale Zelldichte (101 → 117 N) und insbesondere die Dauer der stationären Phase (1 → 3 h) und somit das Lyseverhalten von Veränderungen betroffen waren. Ein Vergleich mit der Ausgangstransformante R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}, welche zwar ebenfalls eine dreistündige stationäre Phase aufwies, aber mit einer Generationszeit von 40 min und maximalen Nephelo von 102 eine schlechtere Disposition als das entsprechende *ciaR*-Inaktivierungsderivat an den Tag legte, ließ erkennen, dass bei Anwesenheit des Mosaik-PBP1a in der T338G-Punktmutante die Funktionalität von CiaRH für die Autolyse keine Rolle mehr spielte und sogar hinsichtlich der Generationszeit und Zelldichte eher störend wirkte.

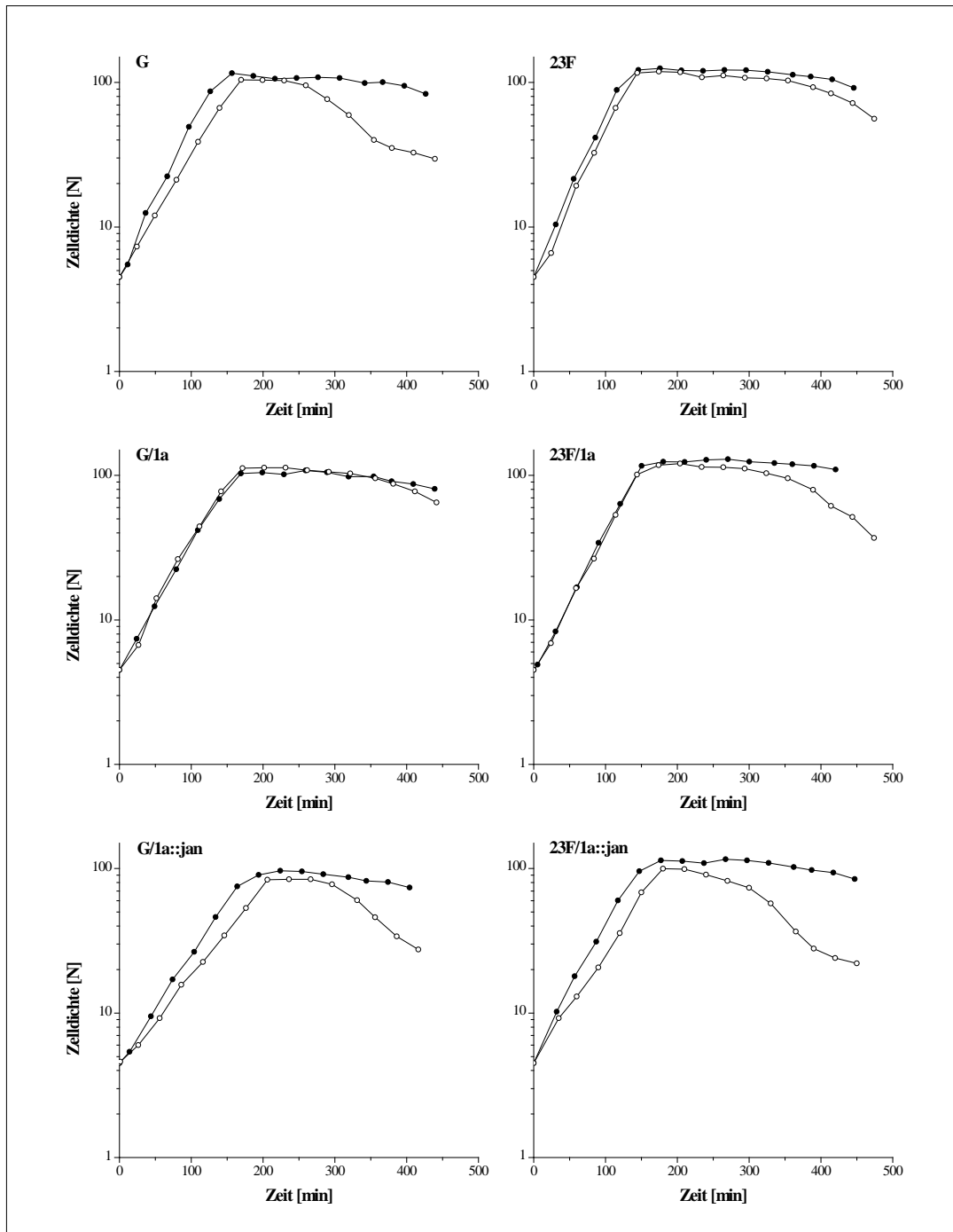


Abb. 3.21: Wachstum der $R6_{pbp2xT338G^-}$ und $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante in Kombination mit verschiedenen *pbp1a*-Allelen und Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Dargestellt ist das Wachstum der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338GciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^-}$, $R6_{pbp2xT338G^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$ und $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.7 aufgeführten Daten. Die Zellichte ist in Nepheloeinheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise repräsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise die jeweiligen *ciaR*-Inaktivierungsderivate. Diagramme: G: $R6_{pbp2xT338G}$; 23F: $R6_{pbp2x2349}$; G/1a: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$; 23F/1a: $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$; G/1a::jan: $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$; 23F/1a::jan: $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^-}$.

Im Gegensatz dazu schien die $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ -Transformante bei Präsenz des Mosaik-PBP1a ein funktionsfähiges CiaRH-System zu benötigen – wenn auch nicht in dem Maße wie $R6_{pbp2xT338G}$ – da sich das Wachstum von $R6_{pbp2x2349pbp1a2349ciaR::aad9}$ (36 min, 107 N, 3 h) im Vergleich zu $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9}$ (30 min, 115 N, 4 h) und der Parentaltransformante $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ (31 min, 120 N, 5 h) verschlechterte (Abb. 3.21 und Tab. 3.7). Insgesamt verhielten sich also die PBP2x/PBP1a-Derivate bezüglich CiaRH genau umgekehrt wie die PBP2x-Derivate $R6_{pbp2xT338G}$ und $R6_{pbp2x2349}$. Die Abwesenheit eines PBP1a in Kombination mit einem nichtfunktionellen CiaRH-System führte jedoch in beiden Fällen zu einer massiven Beeinträchtigung des Wachstums, wobei sich eine solche bereits in den jeweiligen *pbp1a*-Janus-Ausgangsmutanten äußerte (Abb. 3.21 und Tab. 3.7). Durch die Inaktivierung von *ciaR* erfuhr diese allerdings noch eine Steigerung und fand schließlich ihre stärkste Ausprägung in der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9}$ -Mutante mit einer Generationszeit von 50 min, maximalen Zelldichte von 80 N und stationären Phase von nur noch 1 h.

Tab. 3.7: Daten zum Wachstum der $R6_{pbp2xT338G}$ - und $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante in Kombination mit verschiedenen *pbp1a*-Allelen und Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338GciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$, $R6_{pbp2xT338G^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349ciaR::aad9^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a2349^-}$, $R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$ und $R6_{pbp2x2349^-}$ -Mutante zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
$R6_{pbp2xT338G}$	32	113	4,5
$R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$	40	102	3,0
$R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+}$	43	95	2,0
$R6_{pbp2xT338GciaR::aad9}$	38	101	1,0
$R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9}$	38	117	3,0
$R6_{pbp2xT338Gpbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9}$	50	80	1,0
$R6_{pbp2x2349}$	29	122	5,0
$R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$	31	120	5,0
$R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+}$	39	105	4,0
$R6_{pbp2x2349ciaR::aad9}$	30	115	4,0
$R6_{pbp2x2349pbp1a2349ciaR::aad9}$	36	107	3,0
$R6_{pbp2x2349pbp1a::aphIII-rpsL^+ciaR::aad9}$	38	104	1,5

Angesichts der Tatsache, dass das 2349-*pbp1a* einerseits zwar keinen Anstieg, sondern einen Abfall der β -Laktam-Resistenz in der R6_{*pbp2xT338G*}-Mutante hervorrief, andererseits aber die Wachstumsdefizienz in R6_{*pbp2xT338GciaR::aad9*} kompensierte, kam die Frage auf, ob letzteres vielleicht auch für die Resistenz zutrifft und es im genetischen Hintergrund der *ciaR*-Inaktivierung nun doch zu einer Resistenzerhöhung kommen sollte. Bei der Bestimmung der MHK von R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9*} für ein Penicillin (Piperacillin) und Cephalosporin (Cefotaxim) konnten jedoch keine Differenzen zu der Ausgangstransformante R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349*} festgestellt und somit ein solcher Zusammenhang ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

3.1.5 Eine Thr338-Punktmutation und die genetische Kompetenz

Der physiologische Zusammenhang zwischen dem Zwei-Komponenten-System CiaRH und der genetischen Kompetenz in *S. pneumoniae* ist seit der Entdeckung dieses Systems bekannt und wurde durch zahlreiche Studien belegt. So konnte gezeigt werden, dass CiaRH ein Inhibitor der Kompetenz ist und vermutlich benötigt wird, um den kompetenten Zustand zu verlassen (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Merai, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005; Zähler *et al.*, 1996). Ob dieser Zusammenhang direkter oder indirekter Natur ist, konnte allerdings bisher noch nicht geklärt werden. Die Kompetenz ist eng an die Prozesse der Autolyse und Allolyse gekoppelt, welche beide in einer Kultur während des kompetenten Zustands stattfinden (Guiral *et al.*, 2005; Lacks und Neuberger, 1975; Moscoso und Claverys, 2004; Seto und Tomasz, 1975; Steinmoen *et al.*, 2003). Das Hauptautolysin N-Acetylmuramyl-L-alaninamidase LytA ist dabei sowohl an der normalerweise für die stationäre Wachstumsphase typischen Autolyse als auch an der Allolyse beteiligt (Moscoso und Claverys, 2004). Unter den Gesichtspunkten, dass das Cia-System die Kompetenz unterdrückt, eine Inaktivierung des RR CiaR eine Verstärkung der in der stationären Phase auftretenden Autolyse zur Folge hat (diese Arbeit) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006; Kovács, 2009; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003) und in beide Vorgänge LytA involviert ist, stellte sich die Frage nach einem direkten oder indirekten Zusammenhang zwischen der in den PBP2x-Mutanten mit *ciaR*-Inaktivierung beobachteten verstärkten Autolyse (siehe 3.1.4) und der Kompetenz. Zur Aufdeckung einer solchen Verbindung wurden *ciaR*-Inaktivierungsderivate hergestellt, welche keine Kompetenz mehr entwickelten und die daraus resultierenden Folgen auf das Wachstumsverhalten in C-Medium untersucht.

3.1.5.1 Inaktivierung von *comAB* in R6, der C303-, R6_{pbp2xT338G}-Mutante und den entsprechenden *ciaR*-Inaktivierungsderivaten

Zur Ausschaltung der Kompetenz wurde entschieden, den CSP-Transporter ComAB zu inaktivieren. Die Gene *comAB* bilden in *S. pneumoniae* ein Operon, welches am 5'-Ende von zwei Insertionssequenz (IS) -Elementen und am 3'-Ende von *purC*, das Teil eines folgenden Clusters von *pur*-Genen ist, flankiert wird. Da dieses Cluster in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen als signifikant aufgetreten war (siehe 3.2), sollte ein durch die Inaktivierung von *comAB* unter Umständen hervorgerufener Effekt auf die Transkription bzw. Translation dieser Gene möglichst vermieden werden. Auch wenn die *com*- und *pur*-Gene aufgrund einer am Ende von *comB* lokalisierten potentiellen Terminatorstruktur offenbar nicht als Einheit transkribiert werden (Hui und Morrison, 1993), wurde vorsichtshalber eine Resistenzkassette verwendet, welche einen Promotor mit schwacher von *S. pneumoniae* bevorzugter -10-Box besaß und der Terminator mit eingeschlossen. Die Herstellung des zur Inaktivierung von *comAB* eingesetzten Konstrukts wurde von Barbara Thronicke im Rahmen ihres Forschungspraktikums vorgenommen (2008) (siehe 2.7.3.5). Als Resistenzmarker diente die in 3.1.3.3 angesprochene Kanamycin-Resistenzkassette des Plasmids pDG782. Zur Termination der Translation von *comA* wurde jeweils ein Stopcodon in die Sequenzen der entsprechenden Primer eingefügt. Zunächst wurden die Stämme R6 und R6_{ciaR::aad9} mit dem Konstrukt transformiert. Die hergestellten *comAB*-Inaktivierungsderivate waren ohne CSP nicht mehr transformierbar, was allerdings durch die Zugabe komplementiert werden konnte.

Eine Betrachtung des Wachstums von R6_{comAB::aphIII}, R6_{ciaR::aad9comAB::aphIII} im Vergleich mit R6 und R6_{ciaR::aad9} in C-Medium brachte überraschende Ergebnisse zum Vorschein. Die in R6_{ciaR::aad9} beobachtete verfrühte Autolyse am Ende der stationären Wachstumsphase (siehe 3.1.4) wurde durch die *comAB*-Inaktivierung vollständig aufgehoben, ein Befund, den spätere Versuche untermauerten. In der Folge wurden R6_{pbp2xT338GciaR::aad9}, C303_{ciaR::aad9} sowie die entsprechenden Parentalmutanten R6_{pbp2xT338G} und C303 mit dem *comAB::aphIII*-Konstrukt transformiert und ebenfalls das Wachstumsverhalten in C-Medium analysiert. Hierbei trat der weitere unerwartete Effekt zutage, dass die Unterbrechung von *comAB* in den *ciaR::aad9*-Derivaten mit PBP2x-Mutationen nur zu einer teilweisen Aufhebung der verstärkten Autolyse führte (Abb. 3.22 und Tab. 3.8) (siehe 3.1.4). Während bei R6_{ciaR::aad9comAB::aphIII} sich die Dauer der stationären Phase des Wildtyps R6 wieder einstellte (7 h), kam es in R6_{pbp2xT338GciaR::aad9comAB::aphIII} und C303_{ciaR::aad9comAB::aphIII} zu einer deutlichen Verbesserung hinsichtlich ihrer Dauer (1 → 3 h und 0 → 5 h). Zudem konnte für alle drei Mutanten eine nahezu gleiche Generationszeit wie für die jeweiligen Ausgangsstämme R6, R6_{pbp2xT338G} und C303 ermittelt werden. Nebenbei fiel eine charakteristisch verlängerte stationäre Wachstumsphase und verkürzte Generationszeit in R6_{comAB::aphIII}, R6_{pbp2xT338GcomAB::aphIII} und C303_{comAB::aphIII} auf. Diese Mutanten schienen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens eine bessere Leistung zu erbringen als die Ursprungsstämme.

Diese Befunde weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der in den *ciaR*-Inaktivierungsderivaten auftretenden verstärkten Lyse am Ende der stationären Phase und der Kompetenz hin. Während dieses Lyseverhalten beim Wildtyp vollständig der Kompetenz zugeschrieben werden kann, spielen bei den PBP2x-Mutanten noch weitere Faktoren eine Rolle.

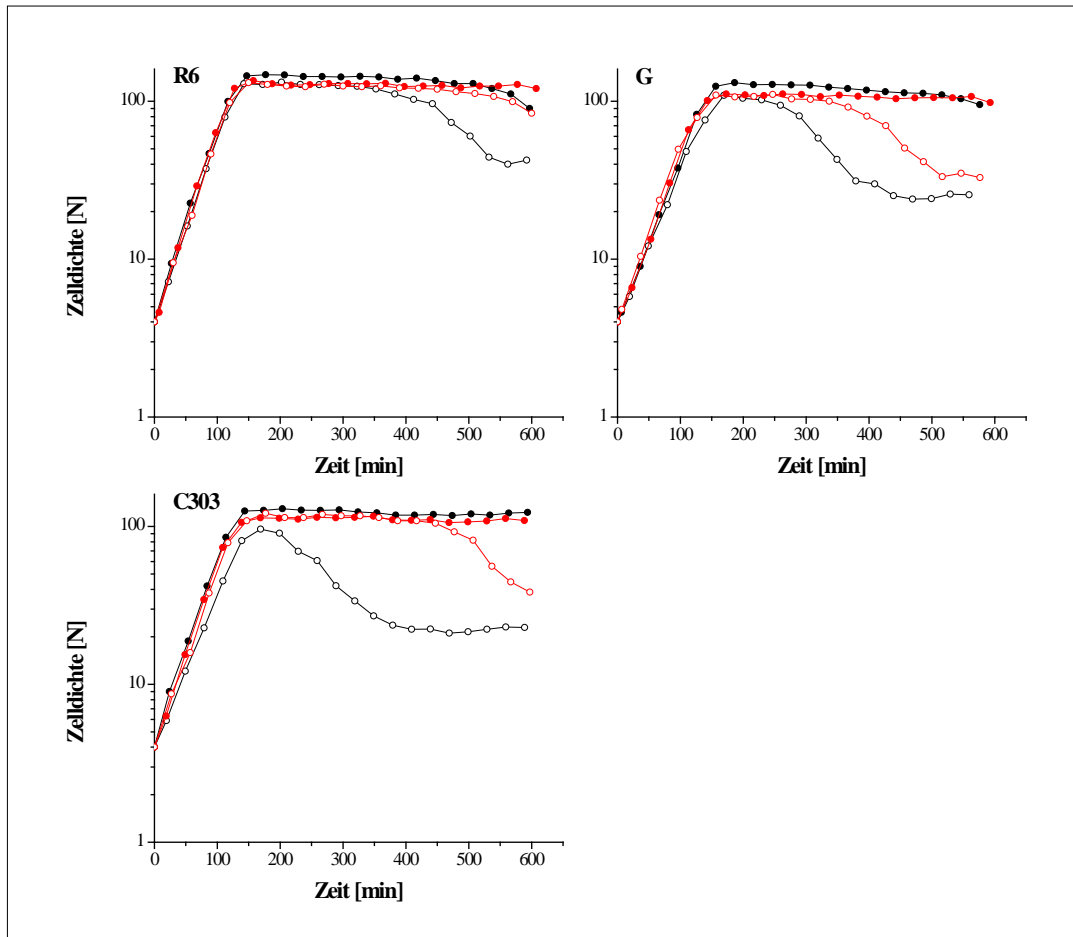


Abb. 3.22: Wachstum von R6, der C303- und R6_{pbp2xT338G}-Mutante in Kombination mit verschiedenen *ciaR*-Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB.

Dargestellt ist das Wachstum der R6_{ciaR::aad9comAB::aphIII⁻}, R6_{comAB::aphIII⁻}, R6_{ciaR::aad9⁻}-Mutante, von R6, der C303_{ciaR::aad9comAB::aphIII⁻}, C303_{comAB::aphIII⁻}, C303_{ciaR::aad9⁻}, C303-, R6_{pbp2xT338GciaR::aad9comAB::aphIII⁻}, R6_{pbp2xT338GcomAB::aphIII⁻}, R6_{pbp2xT338GciaR::aad9⁻} und R6_{pbp2xT338G}-Mutante. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.8 aufgeführten Daten. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Schwarze Kurven kennzeichnen die An-, rote Kurven die Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB. Geschlossene Kreise repräsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise die jeweiligen *ciaR*-Inaktivierungsderivate. Diagramme: R6; G: R6_{pbp2xT338G}; C303.

Tab. 3.8: Daten zum Wachstum von R6, der C303- und R6_{pbp2xT338G}-Mutante in Kombination mit verschiedenen *ciaR*-Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase der R6_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*}⁻, R6_{*comAB::aphIII*}⁻, R6_{*ciaR::aad9*}-Mutante, von R6, der C303_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*}⁻, C303_{*comAB::aphIII*}⁻, C303_{*ciaR::aad9*}⁻, C303⁻, R6_{pbp2xT338G}_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*}⁻, R6_{pbp2xT338G}_{*comAB::aphIII*}⁻, R6_{pbp2xT338G}_{*ciaR::aad9*}⁻ und R6_{pbp2xT338G}⁻-Mutante zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus drei unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	25	137	6,5
R6 _{pbp2xT338G}	29	122	6,0
C303	27	122	> 7,0
R6 _{<i>ciaR::aad9</i>}	26	124	4,0
R6 _{pbp2xT338G} _{<i>ciaR::aad9</i>}	34	103	1,0
C303 _{<i>ciaR::aad9</i>}	32	91	0
R6 _{<i>comAB::aphIII</i>}	25	128	> 8,0
R6 _{pbp2xT338G} _{<i>comAB::aphIII</i>}	28	108	6,0
C303 _{<i>comAB::aphIII</i>}	25	114	> 7,0
R6 _{<i>ciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	25	126	7,0
R6 _{pbp2xT338G} _{<i>ciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	31	110	3,0
C303 _{<i>ciaR::aad9comAB::aphIII</i>}	26	120	5,0

Was die MHK für Cefotaxim anbetraf, so konnten bei R6_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*} bzw. R6_{pbp2xT338G}_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*} keine Unterschiede bzw. eine leichte Abnahme im Vergleich zu R6, R6_{*ciaR::aad9*}, R6_{*comAB::aphIII*} bzw. R6_{pbp2xT338G}, R6_{pbp2xT338G}_{*ciaR::aad9*}, R6_{pbp2xT338G}_{*comAB::aphIII*} festgestellt werden (Abb. 3.23). Im Gegensatz dazu ließen die C303-Derivate eine starke Reduktion der Resistenz erkennen, wobei die MHK von C303_{*ciaR::aad9*}, C303_{*ciaR::aad9comAB::aphIII*} und überraschenderweise auch von C303_{*comAB::aphIII*} von 0,6-1,1 auf 0,06-0,2 und 0,2-0,5 µg/ml Cefotaxim abfiel. Durch die mitgetestete R6_{pbp2xC303}-Transformante, welche eine Cefotaxim-MHK von 0,45-0,5 µg/ml an den Tag legte, konnte geschlussfolgert werden, dass die *ciaR*-Inaktivierung in C303 sowohl zu einem vollständigen Verlust der durch CiaH als auch zu einer teilweisen Einbuße der durch die zwei PBP2x-Punktmutationen vermittelten Resistenz führte, die Inaktivierung von *comAB* hingegen aber ausschließlich ersteres bewirkte (siehe 3.1.4.2). Aufgrund der Tatsache, dass C303 von Natur aus empfänglich für zusätzliche Mutationen in CiaH war, wurde vermutet, dass der in der C303_{*comAB::aphIII*}-Mutante sich äußernde Einfluss von ComAB auf die CiaH-Resistenz womöglich durch während der Transformation aufgetretene *ciaH*-Mutationen hervorgerufen wurde. Eine Sequenzierung des *ciaH*-Allels der C303_{*comAB::aphIII*}-Mutante und zwei weiterer gepickter

-Transformanten ergab neben dem ohnehin bereits in der Ausgangsmutante C303 aufgefallenen D360Y-Austausch (siehe 3.1.4.2) in letzteren beiden, stattdessen eine bisher unbekannte Substitution an Position 207 (V207A) in ersterer Mutante. Da aber bei allen drei Stämmen die MHK im gleichen Bereich lag, erschien der oben genannte Verdacht unbegründet.

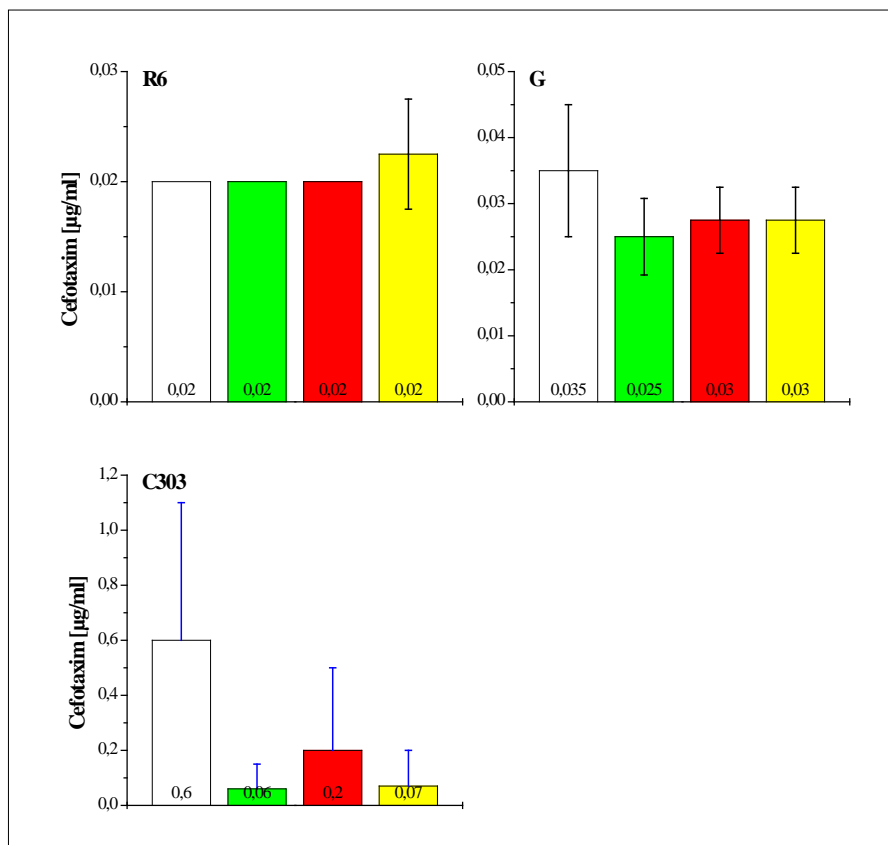


Abb. 3.23: Cefotaxim-Resistenz von R6, der C303- und R6_{pbp2xT338G}-Mutante in Kombination mit verschiedenen *ciaR*-Allelen und Abwesenheit eines funktionellen CSP-Transporters ComAB.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für Cefotaxim der R6_{ciaR::aad9comAB::aphIII⁻}, R6_{comAB::aphIII⁻}, R6_{ciaR::aad9⁻}-Mutante, von R6, der C303_{ciaR::aad9-comAB::aphIII⁻}, C303_{comAB::aphIII⁻}, C303_{ciaR::aad9⁻}, C303⁻, R6_{pbp2xT338GciaR::aad9comAB::aphIII⁻}, R6_{pbp2xT338GcomAB::aphIII⁻}, R6_{pbp2xT338GciaR::aad9⁻} und R6_{pbp2xT338G}-Mutante sind als Säulen in verschiedenen Farben dargestellt. Die Abstufung der Cefotaxim-Konzentrationen erfolgte bis zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml in 0,01er, ab 0,1 µg/ml in 0,05er bzw. 0,1er [µg/ml] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C abgelesen, wobei die Mittelwerte (bei 0,01er Abstufung) bzw. MHK-Bereiche (bei 0,05er bzw. 0,1er Abstufung) aus vier unabhängigen Bestimmungen nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die schwarzen Balken die Standardabweichung an, die blauen Balken die Bereiche, in denen sich die MHK befindet. Die Zahlen am Boden der Säulen zeigen den entsprechenden gerundeten Mittelwert bzw. Beginn des MHK-Bereichs an. Weiße Säulen repräsentieren den Ausgangsstamm, grüne Säulen das *ciaR*-Inaktivierungsderivat, rote Säulen das *comAB*-Inaktivierungsderivat und gelbe Säulen das *ciaRcomAB*-Inaktivierungsderivat. Diagramme: R6; G: R6_{pbp2xT338G}; C303.

3.1.5.2 Transformationseffizienz der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten

Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte eine Bestimmung der Transformationseffizienz der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten. Den damaligen Resultaten wurde allerdings keine weitere Beachtung geschenkt und sie wurden auch nicht verifiziert. Die in 3.1.4.4 und 3.1.5.1 dargelegten Beobachtungen, dass trotz Inaktivierung von *comAB* im genetischen Hintergrund der *ciaR::aad9*-Derivate mit PBP2x-Mutationen nicht jedoch im Wildtyp eine „Rest“-Autolyse und möglicherweise -Kompetenz vorhanden war und dass ein Mosaik-PBP1a in der Lage war, diese Lyse fast vollständig aufzuheben, ließen auf einen von CiaRH unabhängigen Einfluss von PBP auf die Kompetenz schließen und rückten die Ergebnisse für die Transformierbarkeit der Thr338-Mutanten wieder in den Mittelpunkt des Interesses.

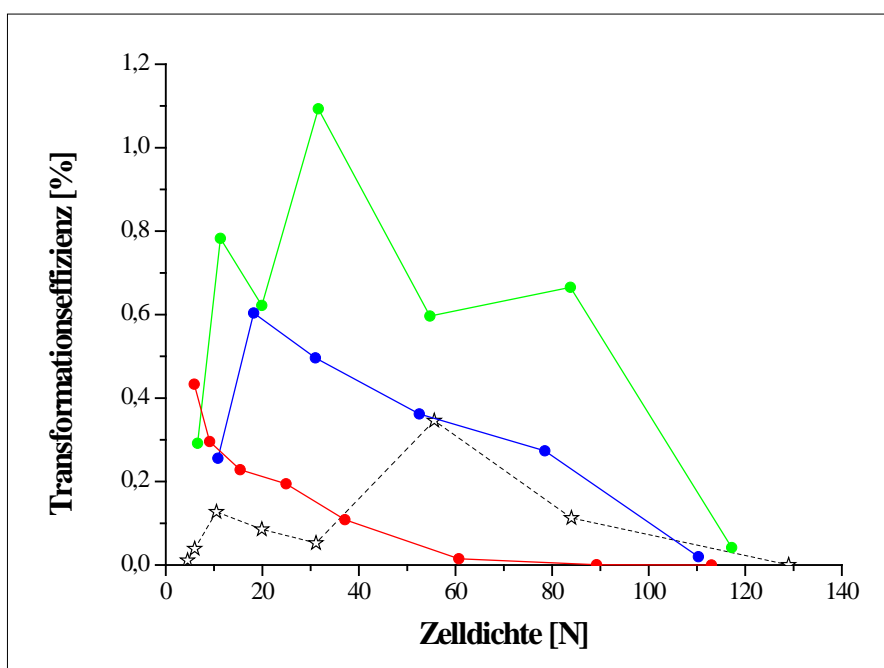


Abb. 3.24: Transformationseffizienz der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten.

Dargestellt ist die Transformationseffizienz der $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten und zum Vergleich von R6 in Abhängigkeit von der Zelldichte. 12 ml C-Medium unter Zusatz von 8 % BSA wurden 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers dokumentiert. Bei definierten Zelldichten wurden Aliquots entnommen und weggefroren. Diese wurden jeweils mit 100-130 ng chromosomaler *S. pneumoniae* *amiA9*-DNA transformiert, 100 μ l von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert und nach 48 h Inkubation bei 37 °C die Transformationseffizienz als prozentualer Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl für jedes Aliquot bestimmt. Zu beachten gilt, dass die Daten für R6 und die $R6_{pbp2xT338}$ -Mutanten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten stammen. Da die Höhe der Transformationseffizienz abhängig von den Transformations-Bedingungen von Experiment zu Experiment variieren kann, können zwar nicht die absoluten Effizienz-Werte, durchaus aber das Kompetenzpeakverhalten von R6 und den Mutanten miteinander verglichen werden. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Kurven: schwarz: R6; grün: $R6_{pbp2xT338A}$; blau: $R6_{pbp2xT338P}$; rot: $R6_{pbp2xT338G}$.

Tatsächlich zeigten sich abhängig von der jeweiligen Punktmutation an Position Thr338 Unterschiede in der Lage und Höhe des Kompetenzpeaks (Abb. 3.24). So konnte eine deutliche Verschiebung des Peaks von $R6_{pbp2xT338A}$ (Nephelo 32), über $R6_{pbp2xT338P}$ (Nephelo 18) bis zu $R6_{pbp2xT338G}$ (Nephelo 6) festgestellt werden. In Korrelation mit dieser Reihenfolge, erreichte $R6_{pbp2xT338A}$ insgesamt die höchsten Werte für die Transformationseffizienz, gefolgt von $R6_{pbp2xT338P}$ und das Schlusslicht bildete $R6_{pbp2xT338G}$. Allen drei Mutanten war jedoch gemeinsam, dass die maximale Effizienz sich zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Wachstum einstellte, um dann bis zur stationären Wachstumsphase kontinuierlich abzunehmen. Der Wildtyp $R6$, welcher zwar nicht parallel mit den Mutanten getestet wurde, für den jedoch die Daten aus einem anderen Experiment zum Vergleich zur Verfügung standen, ließ hingegen eine konstante Transformierbarkeit mit nur wenigen Schwankungen über die gesamte Wachstumsphase erkennen.

3.1.5.3 Transformationseffizienz der $R6_{pbp2xT338G}$ -, $R6_{pbp2x2349}$ -Mutante und der entsprechenden $pbp1a2349$ -Derivate

Um weitere Hinweise für eine mögliche Beeinflussung der Kompetenz durch PBP zu erhalten, wurde die Untersuchung der Transformierbarkeit im Folgenden auf die $R6_{pbp2x2349}$ -Transformante und die Mosaik-PBP1a-Derivate $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ ausgeweitet, wobei $R6_{pbp2xT338G}$ und $R6$ als Vergleich dienten. Hierzu wurde zunächst eine Methode verwendet, die neu im Labor etabliert wurde und sich durch eine bessere Reproduzierbarkeit auszeichnete. Dabei wurden die Vorkulturen nicht in C-, sondern in dem Kompetenz-hemmenden THB-Medium angezogen und in C-Medium ohne Zusatz von BSA überimpft, in dem dann auch die Herstellung der präkompetenten Zellen und die spätere Transformation erfolgte. Diese Vorgehensweise stellte sich aber für die hier zu testenden Stämme als ungeeignet heraus, da $R6_{pbp2xT338G}$ und insbesondere $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ ein stark beeinträchtigtes Wachstum in THB- und nach dem Überimpfen auch in C-Medium zeigten. Auch wenn bei den übrigen Stämmen keinerlei Schwierigkeiten im Wachstum auftraten, mußte, um spätere Vergleiche zu ermöglichen, wieder auf die gewohnte Methode (siehe 2.6.6.2) zurückgegriffen werden. Die Bestimmung der Transformationseffizienz wurde zunächst mit chromosomaler *amiA9*-DNA und Selektion mit Streptomycin durchgeführt, wobei sich ein erneutes Problem auftat. Aufgrund des nach der Anwendung der Janus-Kassette im Genom der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ -Transformante verbliebenen Streptomycin-Resistenzmarkers, waren die Platten hier mit Kolonien übersät (siehe 2.7.3.2). Bei Betrachtung der Transformationseffizienzen der übrigen vier Stämme $R6$, $R6_{pbp2xT338G}$, $R6_{pbp2x2349}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ war eine eindeutige Abhängigkeit der Transformierbarkeit von der Anwesenheit eines bestimmten PBP2x bzw. PBP1a zu erkennen (Abb. 3.25). Während der Wildtyp und die $R6_{pbp2x2349}$ -Transformante über die gesamte exponentielle bis hin zur stationären Wachstumsphase mit Effizienzen zwischen 0,1 und 0,4 % bzw. 0,2 und 0,3 % nahezu gleichbleibend transformierbar waren, traten bei $R6_{pbp2xT338G}$ und $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ charakteristische Veränderungen auf. In Übereinstimmung mit den in 3.1.5.2

aufgeführten Ergebnissen, kam es in der $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante zu einem frühen Auftreten der maximalen Kompetenz (Nephelo 11), gefolgt von einem schnellen Abfall. Die $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$ Transformante legte wiederum ein anderes Verhalten an den Tag; hier war eine um zwei Zehnerpotenzen konstant niedrigere Transformationseffizienz als in R6 und $R6_{pbp2x2349}$ zu verzeichnen.

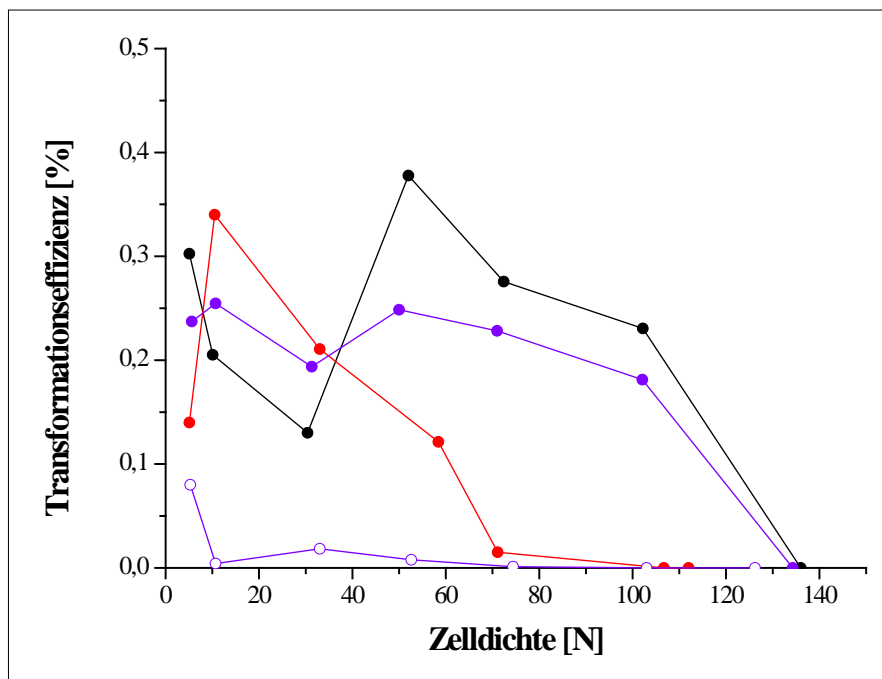


Abb. 3.25: Transformationseffizienz der $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$, $R6_{pbp2x2349-}$ und $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante.

Dargestellt ist die Transformationseffizienz der $R6_{pbp2x2349pbp1a2349-}$, $R6_{pbp2x2349-}$ und $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante und zum Vergleich von R6 in Abhängigkeit von der Zelldichte. 12 ml C-Medium unter Zusatz von 8 % BSA wurden 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers dokumentiert. Bei definierten Zelldichten wurden Aliquots entnommen und weggefroren. Diese wurden jeweils mit 600 ng chromosomaler *S. pneumoniae* amiA9-DNA transformiert, 100 μ l von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert und nach 48 h Inkubation bei 37 °C die Transformationseffizienz als prozentualer Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl für jedes Aliquot bestimmt. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise präsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise das 2349-*pbp1a*-Derivat. Kurven: schwarz: R6; rot: $R6_{pbp2xT338G}$; lila: $R6_{pbp2x2349-}$.

Damit auch die $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349-}$ Transformante in die Analyse miteinbezogen werden konnte, wurde zur Bestimmung der Transformationseffizienz ein Spectinomycin-Resistenzmarker herangezogen. Dieser beruht auf einer Punktmutation in dem Gen *rpsE* (T21P), welches für das 30S-ribosomale Protein S5 codiert, und hatte sich bereits in Vorversuchen, wenn auch nicht als so effizient wie der Streptomycin-Resistenzmarker, aber durchaus für diesen Zweck praktikabel erwiesen. Dazu wurde zunächst einmal ein 2036 bp großes Produkt durch PCR mit chromosomaler DNA des Stammes B6-SpcR-11-AII (Keipert, 2009) als Template und den Primern *rpsE*down_r

und rpsEup_f generiert, welches die besagte Punktmutation, sowie ca. 1000 bp der 5'- und 3'-Umgebung zur homologen Rekombination umfasste. Im Folgenden wurden die Stämme R6, R6_{pbp2xT338G}, R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}, R6_{pbp2x2349} und R6_{pbp2x2349pbp1a2349} unter Verwendung der gewohnten Methode (siehe 2.6.6.2) mit diesem PCR-Produkt transformiert, wobei zur Selektion die im Vorfeld ausgetestete Konzentration von 20 µg/ml Spectinomycin eingesetzt wurde. Die oben dargestellten Kompetenzphänotypen wurden trotz Schwankungen im Wesentlichen bestätigt (Abb. 3.26). Die Transformationseffizienz der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}-Transformante lag wie die von R6_{pbp2x2349pbp1a2349} über das gesamte Wachstum um fast eine Zehnerpotenz unter der von R6, R6_{pbp2xT338G} und R6_{pbp2x2349}. Generell waren alle PBP2x-Mutanten transformierbar, wobei das Kompetenzmuster und -ausmaß scheinbar von der jeweiligen PBP-Ausstattung moduliert wird.

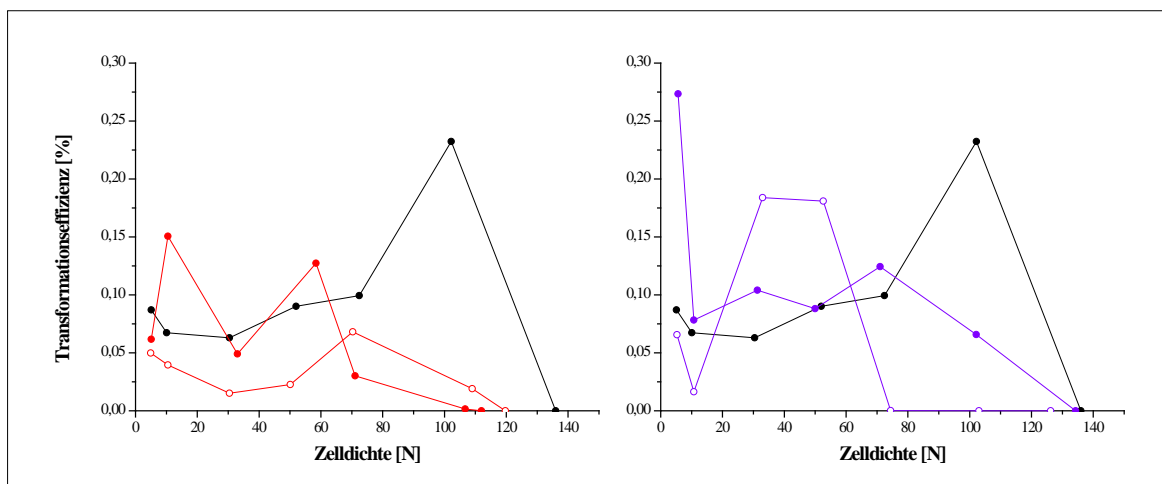


Abb. 3.26: Transformationseffizienz der R6_{pbp2x2349pbp1a2349}⁻, R6_{pbp2x2349}⁻, R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}⁻ und R6_{pbp2xT338G}-Mutante.

Dargestellt ist die Transformationseffizienz der R6_{pbp2x2349pbp1a2349}⁻, R6_{pbp2x2349}⁻, R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}⁻ und R6_{pbp2xT338G}-Mutante und zum Vergleich von R6 in Abhängigkeit von der Zelldichte. 12 ml C-Medium unter Zusatz von 8 % BSA wurden 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers dokumentiert. Bei definierten Zelldichten wurden Aliquots entnommen und weggefroren. Diese wurden jeweils mit 200 ng eines Spectinomycin-Resistenz vermittelnden PCR-Produkts transformiert, mit 20 µg/ml Spectinomycin selektiert, 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert und nach 48 h Inkubation bei 37 °C die Transformationseffizienz als prozentualer Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl für jedes Aliquot bestimmt. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Geschlossene Kreise präsentieren die Ausgangsstämme, offene Kreise die 2349-*pbp1a*-Derivate. Kurven: schwarz: R6; rot: R6_{pbp2xT338G}; lila: R6_{pbp2x2349}.

3.1.6 Eine Thr338-Punktmutation auf globaler Transkriptomebene

Um eine Vorstellung darüber zu erhalten, wie sich die bisher aufgezeigten Befunde bezüglich der Thr338-Punktmutanten auf Transkriptomebene äußerten und um mögliche Regulationsmechanismen und physiologische Zusammenhänge aufzudecken, wurden ausgewählte PBP2x- bzw. PBP1a-Mutanten einer globalen Microarray-basierten Transkriptomanalyse unterzogen (siehe 2.7.4). Die dazu eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Nephelo

von 40 gewonnen, einer Zelldichte, bei der garantiert war, dass sich die zu untersuchenden Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Es wurden nur solche Gene und intergenen Bereichen als signifikant gewertet, welche ein mindestens 2fach erhöhtes oder erniedrigtes Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einen angepassten P-Wert von $\leq 0,01$ (1 %) und eine FDR von $\leq 0,05$ (5 %) zeigten. Durch die Durchführung von drei Arten der Wiederholung (Replicate spots, Dye-swap und Biological replicates) lagen im günstigsten Fall pro Gen acht Werte für das Transkriptmengenverhältnis vor, die zusammen in die Auswertung eingingen. Für alle Experimente wurde zusätzlich zum Standard-Oligonukleotid-Set die Zusatzplatte eingesetzt. Von den insgesamt 309 TIGR4-Oligos, welche ursprünglich Stamm-spezifisch kreiert wurden, zeigten tatsächlich nur etwa 155 Oligos eine Spezifität für TIGR4. Die andere Hälfte wies zusätzlich 80-100 % Homologie zu R6 auf, was erklärt, warum bei den nachfolgenden Transkriptomprofilen auch TIGR4-Gene als signifikant in Erscheinung traten, obwohl mit R6-Derivaten gearbeitet wurde. Signifikante intergene Bereiche wurden aus Zeitgründen nicht näher untersucht, sodass hierauf im Folgenden auch nicht eingegangen wird.

3.1.6.1 Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338G}- und R6_{pbp2x2349}-Mutante

Ein besonderes Interesse galt dem Transkriptomprofil der R6_{pbp2xT338G}- und R6_{pbp2x2349}-Mutante, deren phänotypischer Vergleich bisher im Mittelpunkt dieser Arbeit stand. Beide Transkriptome wurden jeweils mit dem des Referenzstammes R6 verglichen, wobei die dabei als signifikant aufgetretenen Gene und intergenen Bereiche in Tab. 7.3 im Anhang angegeben sind. Da das hier verwendete Oligonukleotid-Set eine Kombination aus Oligos für Gene des Stammes R6 und des nahe verwandten *S. pneumoniae* TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) darstellte, und in zahlreichen Publikationen nicht mit ersterem sondern mit letzterem als Referenz gearbeitet wurde, sind zusätzlich zu den annotierten R6- die homologen TIGR4-Gene angegeben. Zudem konnte den meisten hypothetischen Genprodukten durch Blast-Analyse putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgeführt sind.

In der R6_{pbp2xT338G}-Mutante wiesen auffällig viele Gene einen hohen P-Wert auf, der, wie sich herausstellte, daher herrührte, dass einer der vier Slides gegensätzliche Werte lieferte als die übrigen drei. Da bei dem betroffenen Slide außerdem die Signifikanz einiger Gene unglaublich erschien, wurde im Folgenden auf diesen verzichtet und lediglich die Daten der drei anderen Slides in die Auswertung mit aufgenommen. Von den auf dem DNA-Chip insgesamt vorhandenen 2348 und 488 Oligos für Gene bzw. intergene Regionen traten 112 bzw. zehn als signifikant in Erscheinung. Es handelte sich überwiegend um geclusterte Gene, die anhand der Funktion ihrer Produkte und Veröffentlichungen in sich teilweise überlappende Gruppen zusammengefasst werden konnten: Gene des Kompetenz-Regulons (blau) (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000), für Bakteriocinproduktion und -immunität (lila) (de Saizieu *et al.*,

2000; Lux *et al.*, 2007; Reichmann und Hakenbeck, 2000), Gene des CiaRH-Regulons (rot) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002), des Stickstoffmetabolismus (grün), Kohlenstoffmetabolismus (braun), Glycero(phospho)lipidmetabolismus (gelb) und für (ABC-) Transporter (orange) (Abb. 3.27). Der Begriff „Kompetenz-Regulon“ umfasst hierbei alle Gene, deren Expression durch Zugabe von CSP induziert werden kann. Die Microarray-Studie von Peterson *et al.*, 2004 diente dabei als Definitionsgrundlage. Die Cluster wurden in späteren Transkriptomanalysen immer wieder beobachtet. Daneben gab es vereinzelt Gene, die nicht eingruppiert werden konnten, aber ebenfalls wiederholt ein signifikantes Transkriptmengenverhältnis zeigten. Für die Gruppe des Kompetenz-Regulons konnten 2fach runter- bzw. 2 bis 14fach hochregulierte Gene identifiziert werden, die ausschließlich als verzögert CSP-induziert (*ciaH* (spr0708), spr0931, *spo0J* (spr2046)) und CSP-reprimiert beschrieben wurden. Es handelte sich hierbei jedoch nicht um die „typischen“ Kompetenzgene, sondern um Gene, die für Proteine codieren, welche Funktionen innerhalb des Stoffwechsels wahrnehmen. Bei den Bakteriocinen fielen lediglich die zwei 2fach mehr transkribierten Gene spr1801 und spr1802 auf, deren Produkte vermutlich für die Immunität gegen ein Bakteriocin verantwortlich waren. Innerhalb der Gruppe des CiaRH-Systems traten die Gene *ciaH* (spr0708), spr0782, spr0931, *axe1* (spr1538), *malP* (spr1916), *malM* (spr1917) und *spo0J* (spr2046) als signifikant auf, wobei diese 2fach runterreguliert waren. Eine weitere große Einheit bildeten die Gene des Stickstoffmetabolismus, von denen überwiegend 2 bis 8fach mehr Transkripte im Vergleich zur Referenz vorlagen. Hierunter fielen die *pur*-, *pyr*-, *rib*-, *ilv*-, *gln*-, *liv*- und *car*-Gene, welche für Proteine des Purin-, Pyrimidin- (Nukleotid-, Nukleosid-), Cofaktor-, Vitamin- und Aminosäurestoffwechsels codierten. Weiterhin zählten hierzu auch vier *ald*- und *arc*-Gene, die 2fach weniger transkribiert wurden. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass der Stickstoff-, insbesondere der Pyrimidin- und Glutaminstoffwechsel eine wesentliche Funktion bei der Virulenz in *S. pneumoniae* erfüllt (Hava und Camilli, 2002; Kloosterman *et al.*, 2006). Innerhalb der Gruppe des Kohlenstoffmetabolismus, in die sich die *glg*- und *lac*-Gene, das Cluster spr0504-spr0506 sowie verschiedene PTS-Systeme einreihen, lag eine 2 bis 4fach niedrigere Transkriptionsrate vor. Die Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus (spr1987-1991) legten eine 5 bis 6fach reduzierte Rate an den Tag. Schließlich wurde eine Reihe von signifikanten Genen für (ABC-) Transportproteine beobachtet, welche größtenteils in den Transport von Metaboliten der oben genannten Stoffwechselwege involviert waren, aber auch ein- und zweiwertige Kationen (Na^+ , Mg^{2+}), Phosphat und Oligopeptide beförderten. Oligopeptide stellen nicht nur eine wichtige Nährstoffquelle dar, sondern dienen auch als Signalmoleküle für die interzelluläre Kommunikation. So konnte dem Ami-Oligopeptid-Transportsystem, von dem das Gen *aliB* (spr1382) in dem hier vorliegenden Transkriptionsprofil 3fach höher reguliert war, eine bedeutende Rolle bei der Virulenz und Kompetenz in *S. pneumoniae* zugesprochen werden (Alloing *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1996; Alloing *et al.*, 1998; Alloing *et al.*, 1990; Claverys *et al.*, 2000; Cundell *et al.*, 1995; Kerr

et al., 2004; Pearce *et al.*, 1994). Aber auch die Konzentration zweiwertiger Kationen und Phosphat beeinflusst die Kompetenz (Dintilhac *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 1999; Seto und Tomasz, 1976; Tomasz und Hotchkiss, 1964). Für das Substratbindeprotein PstS eines Phosphat-ABC-Transporters konnte sogar eine Beteiligung an der Penicillin-Resistenz in Pneumokokken nachgewiesen werden (Novak *et al.*, 1999; Soualhine *et al.*, 2005). Während alle anderen Gene durchschnittlich 2 bis 3fach differentiell exprimiert wurden, stach das Gen *phpA* (spr1060), welches für das Histidin-Motiv-enthaltende Protein PhpA codiert, durch seine 14fach erhöhte Expression hervor. Histidin-Motiven kommt eine Bedeutung bei der Bindung von zweiwertigen Ionen, insbesondere Zinkionen zu (Daniels *et al.*, 1998; Omburo *et al.*, 1998).

In der R6_{*php2x2349*}-Transformante ließen 82 Gene und 13 intergene Bereiche ein signifikantes Transkriptmengenverhältnis erkennen. Auch hier konnten die meisten der oben genannten Gen-Cluster identifiziert werden (Abb. 3.28). Konkordant mit der nur geringfügig ausgeprägten „Kompetenz“-Autolyse von R6_{*php2x2349*} in Abwesenheit eines intakten CiaRH-Systems (siehe 3.1.4) und der niedrigeren Transformationseffizienz zwischen Nephelo 40 und 50 im Vergleich zu R6 (siehe 3.1.5.3), waren zahlreiche Kompetenzgene 2 bis 13fach runterreguliert. Diese stellten CSP-reprimierte (spr0264) und früh bzw. spät CSP-induzierte Gene dar. Dabei schien diese Repression nicht durch CiaRH hervorgerufen zu werden, da kein einziges Gen dieses Regulons differentiell transkribiert wurde. Die Regulation der Bakteriocingene, wie dem *blp*-Cluster und entsprechenden Zwei-Komponenten-System 13 (BlpH/BlpR) korrelierte mit der der Kompetenzgene. In der Gruppe des Stickstoff- bzw. Glycero(phospho)lipidmetabolismus bestand eine 2 bis 4fach höhere bzw. 7 bis 19fach niedrigere Transkriptionsrate. Darüber hinaus sollten zwei *hdsS*-Gene erwähnt werden, die jeweils 2fach bzw. 3fach runter- (spr0445) bzw. hochreguliert (spr0446) vorlagen und in späteren Analysen wiederholt mit dieser Regulationskonstellation auftraten. Die HsdS-Proteine sind Teil eines Restriktionsmodifikationssystems des TypI und binden mithilfe zweier Ziel-erkennungdomänen eine spezifische DNA-Sequenz (Murray, 2000).

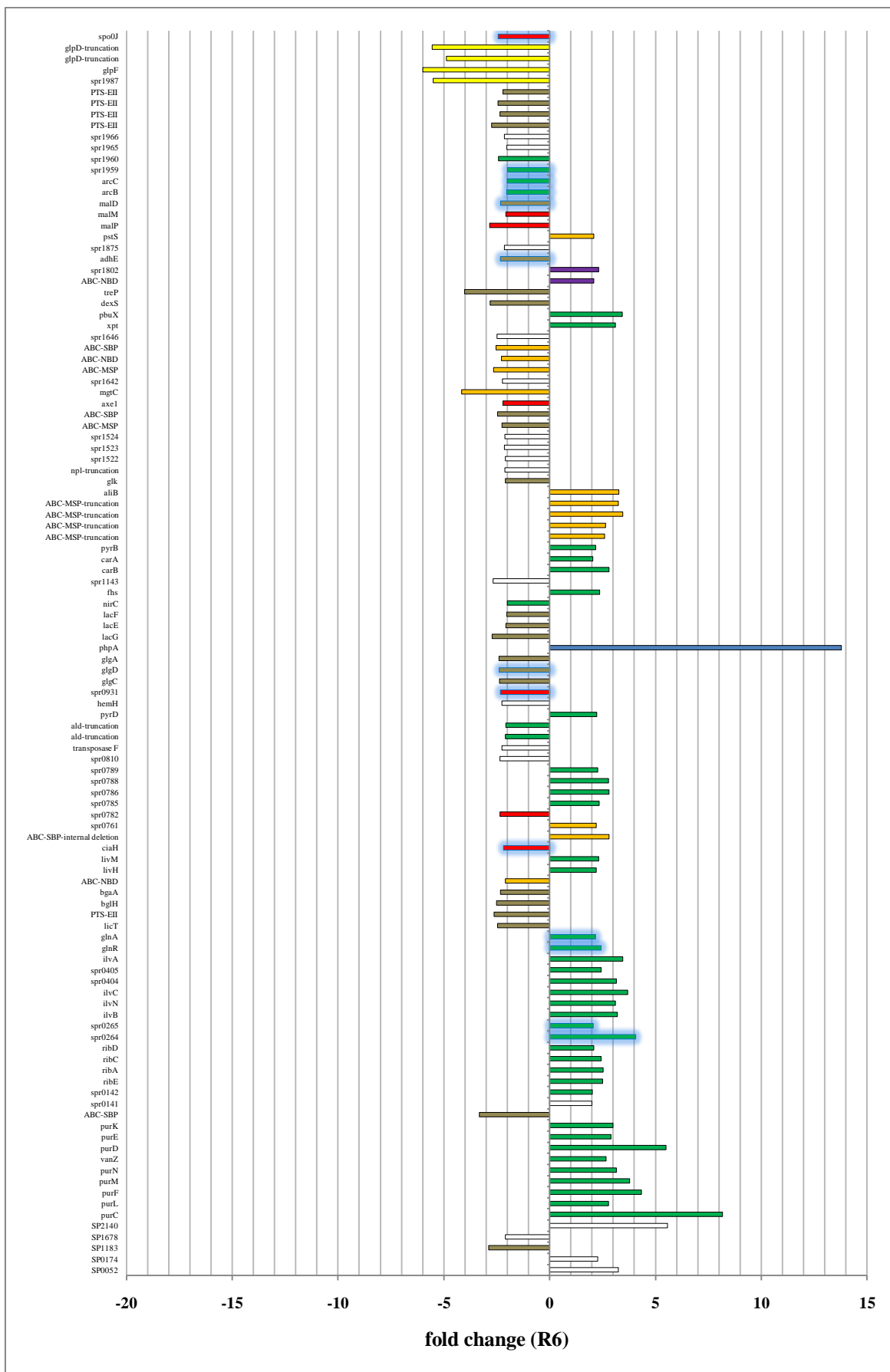


Abb. 3.27: Das Transkriptom der $R6_{pbp2xT338G}$ -Mutante bei einer Zelldichte von $N=40$.
 Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.27: Das Transkriptom der R6_{p_{bbp2x}T338G}-Mutante bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene der R6_{p_{bbp2x}T338G}-Mutante bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.3 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

Der Vergleich des Transkriptionsprofils der R6_{p_{bbp2x}T338G}- und R6_{p_{bbp2x}2349}-Mutante brachte mehrere Unterschiede zutage (siehe Tab. 7.3 im Anhang). Der wohl wichtigste betraf die Kompetenz und die damit verbundene Bakteriocinproduktion, welche in der PBP2x-Mosaiktransformante eindeutig runterreguliert vorlag, in der PBP2x-Punktmutante jedoch unberührt bzw. sich in einem Übergangszustand zu befinden schien, da keine klare Richtung der Regulation und keine frühen und späten bzw. „typischen“ Kompetenzgene ausgemacht werden konnten. Möglicherweise war diese Mutante am Ende der Kompetenzphase angelangt, was durch die bereits dargelegten Daten der Transformationseffizienz-Bestimmung bestärkt werden würde (siehe 3.1.5.2 und 3.1.5.3). Eine weitere bedeutende Abweichung bot sich bei den Genen des CiaRH-Regulons, deren Expression in R6_{p_{bbp2x}T338G} reprimiert, in R6_{p_{bbp2x}2349} unverändert blieb. Grundsätzlich waren in ersterer Mutante mehr Gene für in Stoffwechselfvorgängen agierende Proteine und vermutlich dadurch bedingt für (ABC-) Transporter signifikant, so z. B. für den Stickstoff- oder den in der R6_{p_{bbp2x}2349}-Transformante nicht aufgefallenen Kohlenstoffstoffwechsel. Schließlich existierten aber auch Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Transkriptomen, wie die korrelierende Modulation der Gene des Stickstoff- und Glycero(phospho)lipidmetabolismus.

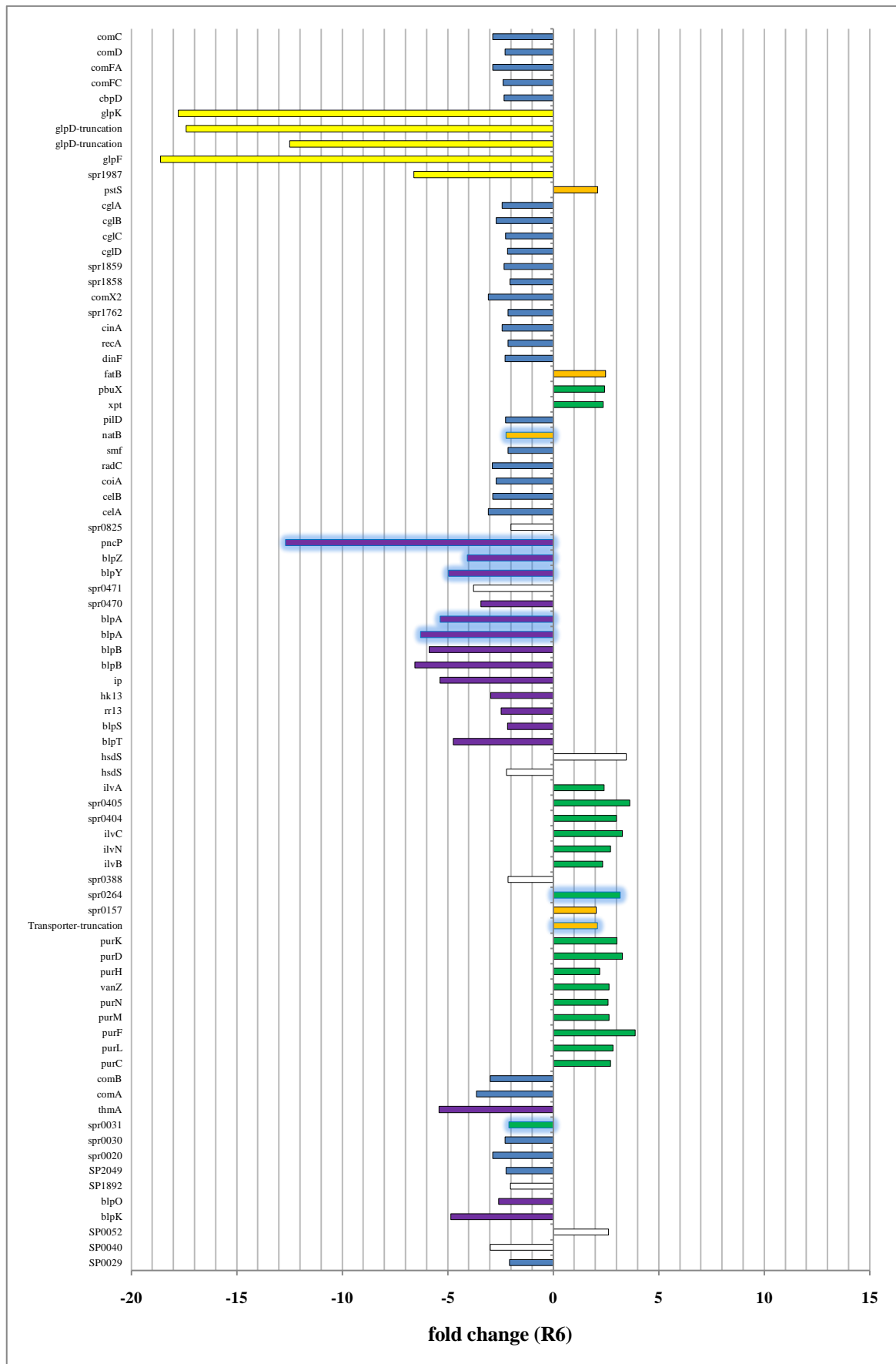


Abb. 3.28: Das Transkriptom der R6_{pbp2x2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40. Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.28: Das Transkriptom der R6_{pbp2x2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene der R6_{pbp2x2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.3 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

3.1.6.2 Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}- und R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante im Vergleich

Im Weiteren sollte nun durch die direkte Gegenüberstellung der Transkriptionsmuster von R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349} und R6_{pbp2x2349pbp1a2349} Anhaltspunkte für die unterschiedlichen Resistenzphänotypen der beiden Transformanten gefunden werden. Dabei erwies sich die Strategie, R6 nicht als Referenz heranzuziehen, als unpraktikabel, da hierdurch ein Abgleich mit allen anderen in dieser Arbeit erstellten Profile, welche sich überwiegend auf R6 stützten, erschwert wurde. Der Vergleich des Transkriptoms von R6_{pbp2x2349pbp1a2349} mit dem von R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349} lieferte von den insgesamt 2348 und 488 Oligos für Gene und intergene Regionen 177 bzw. 23 mit einem signifikanten Transkriptmengenverhältnis. Diese sind mit den jeweiligen homologen TIGR4-Genen und Blast-Resultaten der hypothetischen Proteine in Tab. 7.4 im Anhang zusammengefasst. Darüber hinaus wurden die Gene zu den oben beschriebenen Gruppierungen zusammengefasst und in Abb. 3.29 graphisch dargestellt.

In Übereinstimmung mit der im Vergleich zu R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349} stärkeren „Kompetenz“-Autolyse in Gegenwart eines nichtfunktionellen CiaRH-Systems (siehe 3.1.4.4) und der höheren Transformationseffizienz zwischen Nephelo 40 und 50 (siehe 3.1.5.3) waren die Kompetenzgene, darunter *lytA* (spr1754) (blau) (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000) in der R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante bis zu 45fach hochreguliert, und wiesen demnach die markanteste Transkriptionsveränderung aller signifikanten Gene auf. Es handelte sich um CSP-reprimierte (*phpA* (spr1060), *glnP* (spr1120)), früh, spät und verzögert CSP-induzierte Kompetenzgene. Hierbei konnte ähnlich wie bei R6_{pbp2x2349} kein Zusammenhang zwischen CiaRH und diesem Effekt ausgemacht werden. So waren die zwei am stärksten Cia-abhängigen Gene *sphtra* (spr2045) und *spo0J* (spr2046) (rot) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002) sogar 2fach höher reguliert, sodass unter Annahme einer negativen Regulation der Kompetenz durch Cia eigentlich von einer Repression der Transkription der Kompetenzgene ausgegangen werden sollte. In Anbetracht der

Tatsache, dass die Gene *ciaR* (spr0707), *ciaH* (spr0708), *sphtra* (spr2045) und *spo0J* (spr2046) aber selbst unter der Kontrolle des ComDE-Systems stehen, sollte hier vielleicht vielmehr ein umgekehrter Einfluss angenommen werden. Entsprechend der Kompetenz war die Genexpression der Bakteriocin-Gruppe (lila) (de Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007; Reichmann und Hakenbeck, 2000) bis zu 29fach gesteigert. Innerhalb der Gruppe des Stickstoffmetabolismus (grün), die durch die *arg*-Gene erweitert wurde, zeigten die *pur*-, *pyr*- und *car*-Gene einen 2 bis 4fachen Anstieg der Transkriptionsrate, die *ilv*- und *arg*-Gene einen 2 bis 3fachen Abfall. Die Gene des Glycero(phospho)lipidstoffwechsels (spr1987-1991) (gelb) waren 4 bis 9fach runterreguliert. Für den Kohlenstoffmetabolismus (braun), der insbesondere durch die Gene für die Verwertung von Cellobiose unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems 8 (spr0276-spr0282) (McKessar und Hakenbeck, 2007) ergänzt wurde, bot sich ein gemischtes Bild. Während diese ein bis zu 18fach niedrigeres Transkriptmengenverhältnis aufwiesen, war es bei den Genen für PTS-Systeme 2fach erhöht. Bei den (ABC-) Transportproteinen (orange) konnten neben den in 3.1.6.1 erwähnten auch Gene für ein Acetoin-Transportsystem, wie das *ytr*-Cluster (spr1558-spr1560) beobachtet werden. Dieses wird womöglich durch den von spr1558 codierten putativen transkriptionellen Regulator YtrA reguliert, scheint aus einer ATPase (spr1559) und Permease (spr1560) zu bestehen und wurde 2 bis 3fach mehr transkribiert. Dem in *Bacillus (B.) subtilis* genetisch ähnlich organisierten *ytr*-Operon kommt eine Rolle bei der Aufnahme von Acetoin in Abwesenheit ausreichender Kohlenstoff- und Energiequellen zu (Yoshida *et al.*, 2000). Die Gene für Transporter von Mn^{2+} (*psa*-Cluster), Fe^{2+} bzw. Oligopeptiden ließen eine 2 bzw. 3fache Reduktion, von Mg^{2+} , Na^+ bzw. Phosphat einen 2 bis 6fachen Anstieg der Transkriptmenge erkennen. Für die *psa*-Gene wurde eine Beteiligung an der Virulenz, Penicillin-Toleranz und Kompetenz in *S. pneumoniae* nachgewiesen, wobei sie erstere und letztere unterstützen, die Toleranz jedoch durch Triggern der Autolyse herabsetzen (Berry und Paton, 1996; Dintilhac *et al.*, 1997; Kloosterman *et al.*, 2008; Marra *et al.*, 2002; Novak *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2002). Abschließend waren viele Einzelgene auffällig, wie z. B. das 5fach bzw. 18fach weniger exprimierte *prtA* (spr0561) bzw. in 3.1.6.1 genannte *phpA* (spr1060) (Daniels *et al.*, 1998; Omburo *et al.*, 1998). Das Gen *prtA* codiert für eine Zellwand-gebundene Subtilisin-artige Serin-Protease, bei der es sich um einen Virulenzfaktor in Pneumokokken handelt (Bethe *et al.*, 2001).

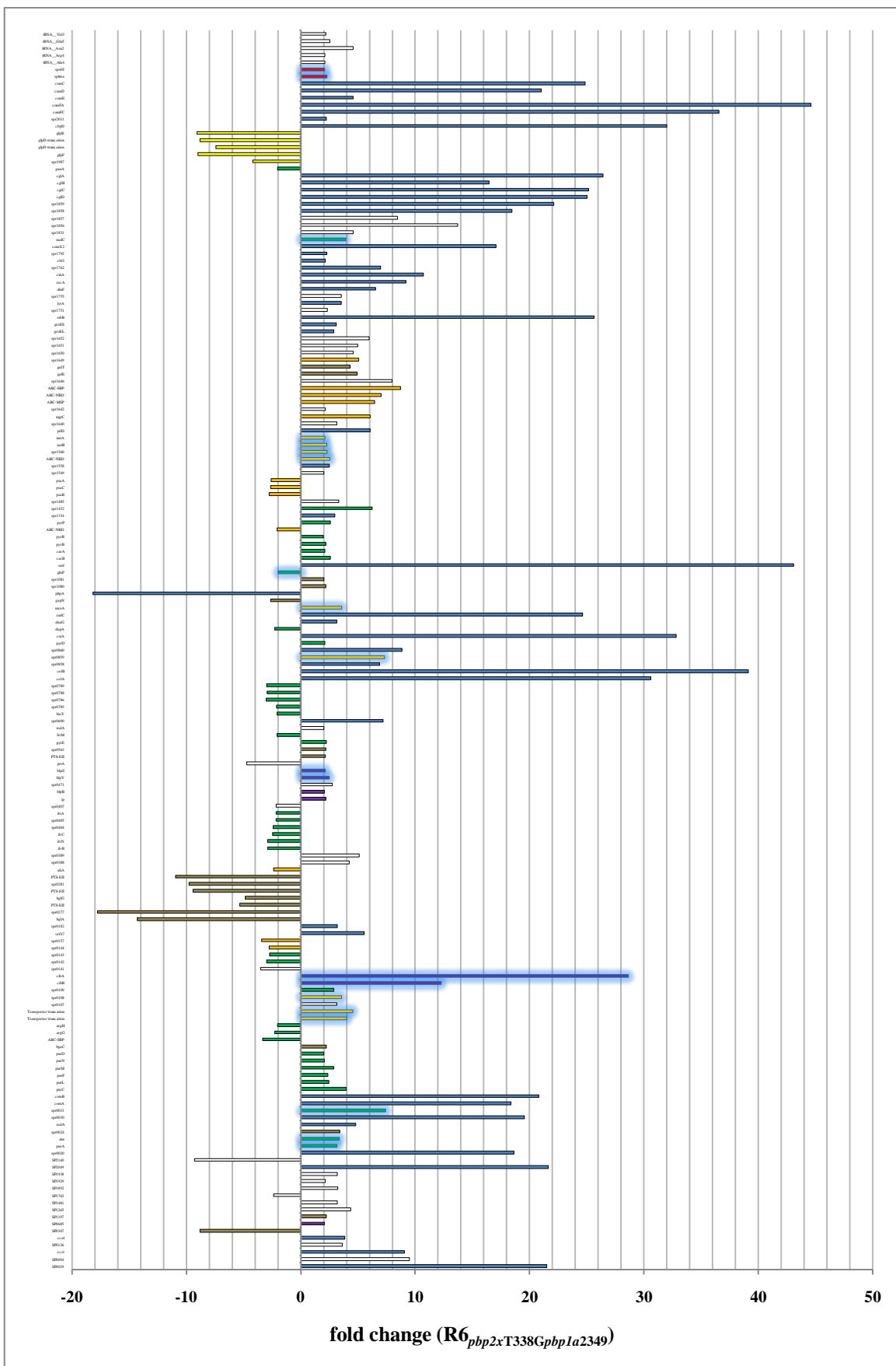


Abb. 3.29: Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}- und R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40 im Vergleich. Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.29: Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}- und R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40 im Vergleich.

Dargestellt ist die fold change zu R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349} der Gene der R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.4 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

3.2 Globale Transkriptomanalyse von spontanresistenten *Streptococcus pneumoniae*-Mutanten mit Punktmutationen im PBP2x

Die Entstehung von β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* stellt einen in mehreren Schritten ablaufenden Prozess dar. Um die genetische Basis dieser Resistenzentwicklung zu verstehen, wurden ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Laborstamm R6 unabhängige Familien von spontanresistenten Mutanten mit schrittweise steigenden Cefotaxim-Konzentrationen selektioniert und analysiert (Laible und Hakenbeck, 1987). Es wurde gezeigt, dass die Resistenzhöhung dieser Mutanten mit einer sukzessiven Akkumulation von Punktmutationen in PBP2x und der HK CiaH des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH einhergeht, welche somit als erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante identifiziert werden konnte (Guenzi *et al.*, 1994). Durch eine Reihe von Untersuchungen war es möglich, die mit diesen Modifizierungen einhergehenden Phänotypen zu charakterisieren und einen Zusammenhang zwischen den PBP2x- und CiaH-Mutationen über die Kompetenz, Autolyse und Resistenz herzustellen (diese Arbeit, siehe 3.1.4 und 3.1.5.1) (Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Wie sich das Zusammenwirken zwischen einerseits den PBP2x-Mutationen und der Zellphysiologie und andererseits ersteren und CiaRH auf regulatorischer bzw. transkriptioneller Ebene gestaltet wurde jedoch nur in Teilen geklärt. Zur Aufdeckung solcher Mechanismen und möglichen Identifizierung bislang unbekannter oder unzureichend charakterisierter Nicht-PBP-Resistenzdeterminanten sollte eine globale Microarray-basierte Transkriptomanalyse ausgewählter Mitglieder der oben erwähnten Familien spontanresistenter Mutanten durchgeführt werden. Dabei stand als Grundlage das in Kooperation mit der Firma Operon neu entwickelte kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set zur Verfügung, das durch eine Optimierung des alten R6-Oligonukleotidsets der Firma MWG Biotech eine erweiterte und bessere Datengenerierung ermöglichte.

3.2.1 Globale Transkriptomanalyse der Mutantenfamilie C006

Für die globale Transkriptomanalyse wurde zunächst einmal die C006-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Labormutanten ausgewählt (Laible und Hakenbeck, 1987). Diese Familie setzt sich aus sechs Mitgliedern (C106 bis C606) zusammen, welche sich durch eine zunehmende Cefotaxim-Resistenz auszeichnen (Abb. 3.30). Später wurde zudem eine siebte Mutante (C706) isoliert, die allerdings aufgrund einer starken Verunreinigung der ursprünglichen Glycerinkultur nicht in die Analysen miteinbezogen wurde. Die Mutanten sind bereits eingehend geno- und phänotypisch charakterisiert worden (Laible und Hakenbeck, 1987, 1991; Laible *et al.*, 1989; Maurer *et al.*, 2008). So wurde auf den ersten und letzten beiden Selektionsstufen jeweils eine PBP2x-Punktmutation nachgewiesen, auf der dritten ein CiaH-Austausch und auf der vierten ein vorzeitiger Abbruch von PBP2a, verursacht durch einen 119 bp-Sequenzrepeat nach 1568 bp im *pbp2a*-Gen. Ab der dritten Mutante (C306) tritt ein Kompetenzverlust auf, der alleine auf die Aminosäuresubstitution T230P in CiaH zurückgeführt werden konnte, von der angenommen wird, dass sie das CiaRH-System in einen „aktivierten Zustand“ („ON-ähnlichen Zustand“) versetzt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Mascher, 2001).

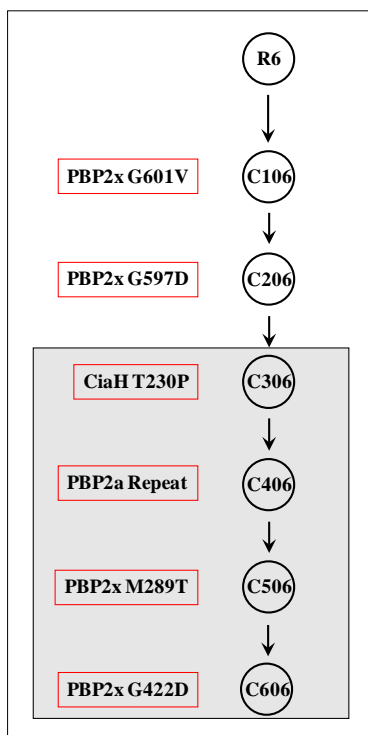


Abb. 3.30: Zusammensetzung der C006-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.

Dargestellt ist die C006-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten und die in den einzelnen Mitgliedern identifizierten Mutationen. Ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Laborstamm R6 wurden unabhängige Familien von spontanresistenten Mutanten mit schrittweise steigenden Cefotaxim-Konzentrationen selektioniert. Dabei ging diese Resistenzhöhung mit einer Akkumulation von Punktmutationen einher, wobei in nahezu allen Fällen ein Selektionsschritt mit dem Auftreten einer Punktmutation in PBP2x oder CiaH korrelierte. Zudem kam es in jeder Familie ab einer bestimmten Stufe zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz. Zur Nomenklatur: C steht für Cefotaxim; die erste Ziffer gibt die Selektionsstufe an, die letzte die Familie. Die Kreise symbolisieren einzelne Mutanten, links daneben befindet sich rot umrandet die in der jeweiligen Mutante aufgetretene Mutation. Der graue Kasten verdeutlicht die in der C006-Familie ab der dritten Stufe zu beobachtende Kompetenzdefizienz.

Die C006-Familie bot sich aus mehreren Gründen als Untersuchungsobjekt an. Sie wies die meisten PBP2x-Mutationen von allen Mutantenserien auf, dazu in Kombination mit einem veränderten *ciaH*-Allel, sodass eine gleichzeitige Betrachtung der durch PBP2x aber auch der durch die Kombination von PBP2x und CiaRH hervorgerufenen transkriptionellen Auswirkungen mög-

lich war. Weiterhin machte sich in der höchsten Mutante (C606) eine Besonderheit hinsichtlich der Cefotaxim-Resistenz und PBP2x-Menge bemerkbar. Was erstere betraf, so war hier eine Temperatursensitivität zu verzeichnen, d. h., dass bei 37 °C eine wesentlich geringere MHK erreicht wurde als bei 30 °C Inkubation (Krauß *et al.*, 1996). Gleichzeitig wurde eine verminderte PBP2x-Menge in der Zelle detektiert, die offenbar durch die von CiaRH regulierte Serin-Protease HtrA hervorgerufen wurde (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009).

Auch wenn diese Familie bereits charakterisiert wurde, sollte zu Beginn der Transkriptomanalysen eine erneute genetische und phänotypische Darstellung sicherstellen, dass es sich auch wirklich um die ursprünglichen Mutanten handelte, sodass die in dieser Arbeit erzielten Resultate mit den zuvor gemachten Beobachtungen in Beziehung gesetzt werden konnten.

3.2.1.1 Wachstumsverhalten und Cefotaxim-Resistenz der Mutantenfamilie C006

Nach Verifizierung des korrekten genetischen Hintergrundes der C006-Mutanten durch Sequenzierung wurde deren Wachstumsverhalten in C-Medium untersucht.

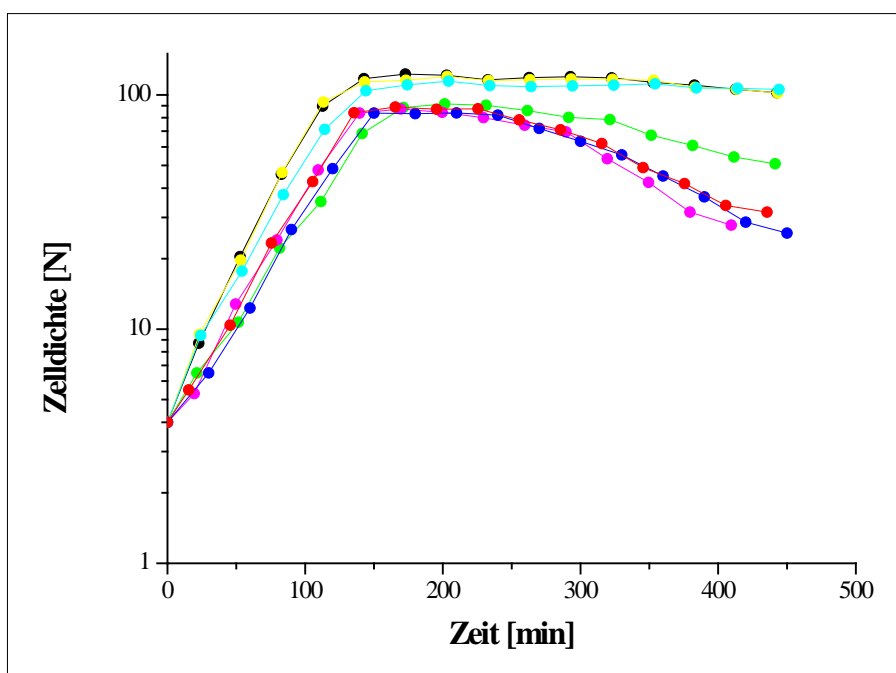


Abb. 3.31: Wachstum der Mutantenfamilie C006.

Dargestellt ist das Wachstum von C106, C206, C306, C406, C506, C606 und zum Vergleich von R6. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.9 aufgeführten Daten. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Kurven: schwarz: R6; gelb: C106; türkis: C206; grün: C306; rosa: C406; blau: C506; rot: C606.

Wie aus Abb. 3.31 und Tab. 3.9 ersichtlich wird, verschlechterte sich das Wachstum ausgehend von R6 kontinuierlich mit steigender Selektionsstufe bis zur Mutante C406, ab der es dann unveränderlich beeinträchtigt blieb. So setzte bereits eine Verminderung der maximalen Zelldichte im Vergleich zu R6 ab C106 ein, gefolgt von einer zusätzlichen Zunahme der Generationszeit ab C206 und schließlich einer kürzeren Dauer der stationären Phase ab C306. In C406 fiel erneut die finale Nephelo, die stationäre Wachstumsphase verkürzte sich, während bei der Generationszeit nochmal eine leichte Erholung eintrat. Die Mutanten C506 und C606 zeigten verglichen mit C406 keine weitere Verschlechterung des Wachstums mehr.

Tab. 3.9: Daten zum Wachstum der Mutantenfamilie C006.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase von C106, C206, C306, C406, C506, C606 und zum Vergleich von R6 zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus zwei unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	25	125	5,0
C106	25	121	5,0
C206	28	113	5,0
C306	31	101	2,0
C406	30	92	1,0
C506	28	93	1,0
C606	28	95	1,0

Die Ermittlung der MHK erfolgte aufgrund der beschriebenen Temperatursensitivität von C606 sowohl bei 37 als auch bei 30 °C Inkubation. Bei beiden Temperaturen war eine stetige Zunahme der Cefotaxim-Resistenz von R6 bis zu C506 zu verzeichnen (Abb. 3.32). Es wurde bis auf den Anstieg zwischen R6 und C106, der größer bzw. C306 und C406, der kleiner ausfiel, fast immer eine Verdopplung der MHK beobachtet. Für die Mutanten C106 bis C406 deckten sich die bei 37 und 30 °C erhaltenen MHK-Bereiche weitgehend, C506 ließ hingegen deutlich niedrigere Werte bei 30 °C erkennen. Was die Mutante C606 betraf, so konnte die bei 37 °C Inkubation beobachtete Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim ganz klar bestätigt werden. Zudem schien die in C606 hinzukommende PBP2x-Punktmutation keine weitere Cefotaxim-Resistenz mehr zu vermitteln; im Gegenteil, es kam sogar zu einem leichten Abfall der MHK bei 30 °C im Vergleich zur Vorgängermutante C506.

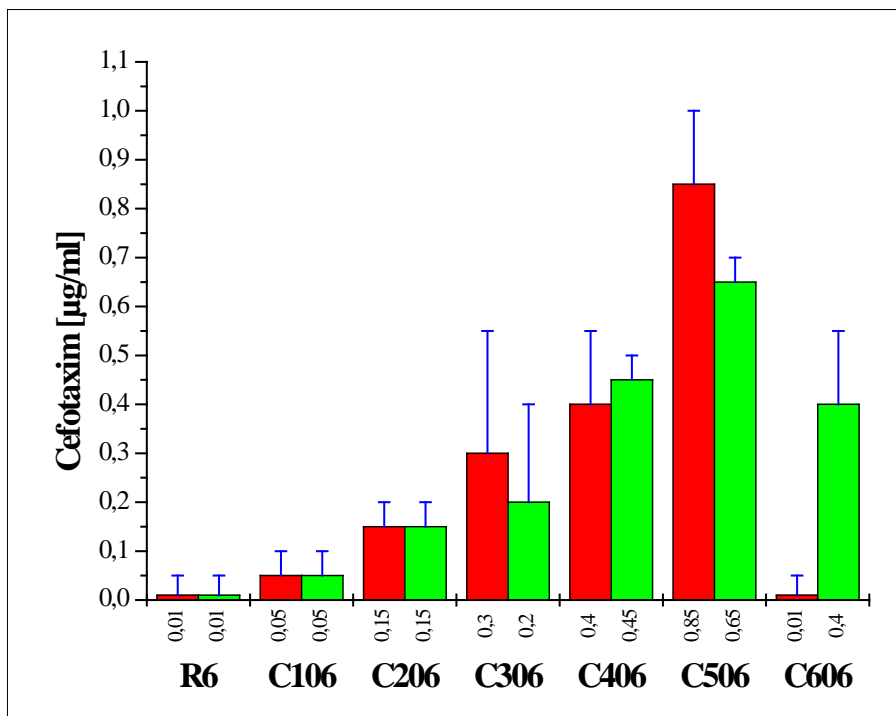


Abb. 3.32: Cefotaxim-Resistenz der Mutantenfamilie C006.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für Cefotaxim von C106, C206, C306, C406, C506, C606 und zum Vergleich von R6 sind als grüne und rote Säulen dargestellt. Die Abstufung der Cefotaxim-Konzentrationen erfolgte bis zu einer Konzentration von 1,0 µg/ml in 0,05er bzw. 0,1er, ab 1,0 µg/ml in 0,1er [µg/ml] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 30 und 37 °C abgelesen, wobei die MHK-Bereiche aus zwei unabhängigen Bestimmungen nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die blauen Balken die Bereiche an, in denen sich die MHK befindet, die Zahlen am Boden der Säulen den Beginn des MHK-Bereichs. Grüne Säulen symbolisieren eine Inkubation bei 30 °C, rote Säulen bei 37 °C.

Offensichtlich war C606 anfällig für einen Verlust der Temperatursensitivität, da zu Beginn der Arbeit beim Testen mehrerer Kulturen von C606 aus der Stammsammlung, sowohl bei 37 als auch 30 °C Anzucht, kein Klon auffindig gemacht werden konnte, der diese Sensitivität an den Tag legte. Darüber hinaus sah es so aus, als ob mit ihrem Wegfall ein Zuwachs der Cefotaxim-Resistenz einherging, da alle getesteten Klone gleichzeitig eine bedeutend höhere MHK (> 1 µg/ml) aufwiesen als die gegenwärtig betrachtete C606-Mutante. Überraschenderweise blieb aber durchaus eine Temperatursensitivität gegenüber dem Penicillin-Derivat Oxacillin bestehen (nicht gezeigt). Wie die MHK-Bestimmung der mit dem *pbp2x* von C606 transformierten R6_{*pbp2x*C606}-Transformanten T1 und T3 bis T8 ergab, war es möglich die durch dieses PBP2x vermittelte Resistenz in einen sensitiven genetischen Hintergrund zu übertragen. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass die auf der fünften und sechsten Selektionsstufe eingeführten Punktmutationen M289T und G422D, wie für letztere bereits in der Ursprungsmutante beobachtet (siehe oben), in diesem Kontext keine weitere Erhöhung der MHK mehr bewirkten (nicht gezeigt) (Koch, 2006; Laible und Hakenbeck, 1991; Maurer *et al.*, 2008). Ferner gelang es, die Temperatur-

sensitivität in R6 zu übertragen, wenn sie auch nicht mit einzelnen PBP2_{xC606}-Mutationen in Zusammenhang gebracht werden konnte (nicht gezeigt) (Koch, 2006). Vermutlich lag sie in einer ganz bestimmten Kombination dieser Mutationen begründet.

Generell kann festgehalten werden, dass die Zunahme der Resistenz in der C006-Familie von Veränderungen im Wachstums- und Lyseverhalten begleitet wurde, wobei die Einführung der CiaH-Mutation auf der dritten Stufe offenkundig eine große Auswirkung auf das Lyseverhalten und die Generationszeit hatte, aber nur eine geringe auf die Cefotaxim-Resistenz. In der Folge wurden diese Effekte in der C506- und C606-Mutante wieder teilweise aufgehoben.

3.2.1.2 Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006

Die zur Transkriptomanalyse (siehe 2.7.4) der C006-Mutantenfamilie verwendete Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Nephelo von 40 gewonnen. Wie in 3.2.1.1 ermittelt wurde, befanden sich bei dieser Zelldichte alle Mitglieder in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurde von einer Signifikanz ausgegangen, wenn ein mindestens 2facher Transkriptionsunterschied ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), ein angepasster P-Wert von $\leq 0,01$ (1 %) und eine FDR von $\leq 0,05$ (5 %) vorlag. Durch drei Arten der Wiederholung (Replicate spots, Dye-swap und Biological replicates) gingen im Idealfall acht Werte pro Gen in die Auswertung ein. Für alle Experimente fand das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set ohne Zusatzplatte Verwendung, wobei das Transkriptionsprofil jeder einzelnen Mutante jeweils mit dem des Referenzstammes R6 verglichen wurde. Eine Aufstellung aller in der Familie als signifikant aufgetretenen Gene und intergenen Bereiche nebst TIGR4-Homologen und Ergebnissen der Blast-Analysen hypothetischer Genprodukte ist in Tab. 7.5 im Anhang zu finden. Die Erklärung für die Signifikanz der TIGR4-spezifischen Gene wurde bereits in 3.1.6.1 geliefert. Auf signifikante intergene Regionen wird aufgrund fehlender Untersuchungen im Nachstehenden nicht näher eingegangen.

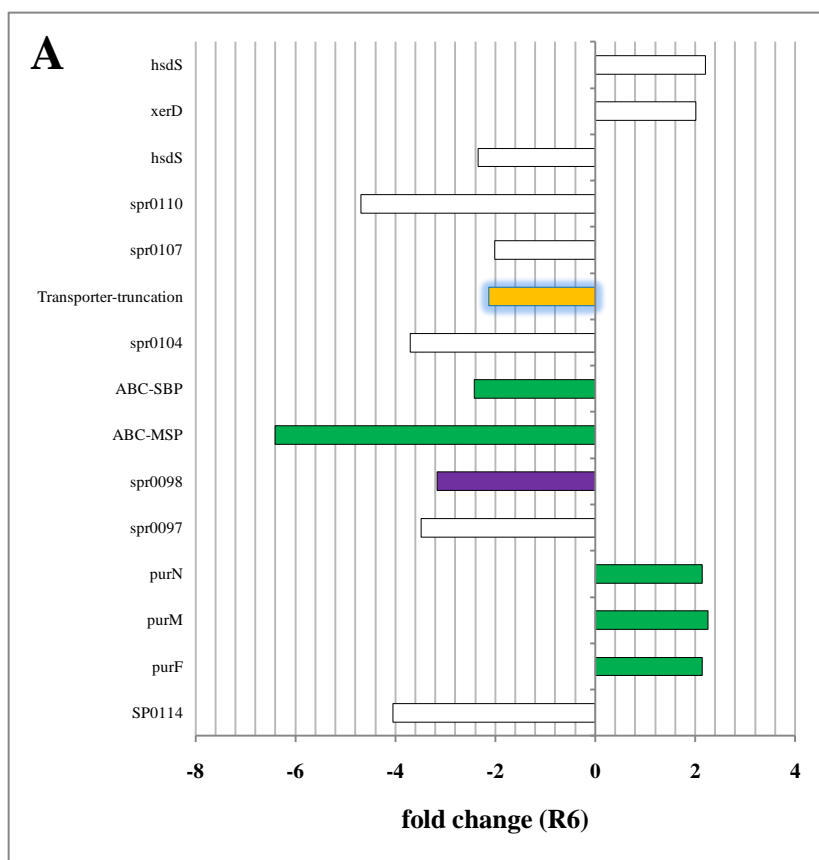
Von den auf dem DNA-Chip insgesamt vorhandenen 2348 und 488 Oligos für Gene bzw. intergene Regionen ließen in C106 15 bzw. zwei, in C206 87 bzw. acht, in C306 111 bzw. 16, in C406 73 bzw. neun, in C506 54 bzw. acht und in C606 176 bzw. 20 ein signifikantes Transkriptmengenverhältnis erkennen. Alle der in 3.1.6 vorgestellten funktionellen Gen-Gruppen konnten auch hier detektiert werden. Die sechs Transkriptome wurden nach diesen Gruppen sortiert und in Abb. 3.33 A, B, C, D, E, F und Tab. 7.5 im Anhang dargestellt. Es zeigten in allen Mutanten durchweg zwei große Gen-Cluster und zwei bzw. drei einzelne Gene eine differentielle Expression. Hierbei handelte es sich zum einen um Gene des Stickstoffmetabolismus (grün), um die Gene spr0096 bis spr0110 (ohne spr0105) sowie um *hsdS*-Gene. Was ersteren betraf, so waren in C106 zunächst lediglich drei *pur*-Gene mit einer 2fachen Erhöhung der Transkriptionsrate zu verzeichnen, welche in C206 durch die restlichen des *pur*-Operons, die *sul*-, *ilv*-, *gln*- und *arg*- und schließlich in C606 durch die *car*- und *nrd*-Gene ergänzt wurden. Während die *pur*-, *sul*- und *arg*-Gene daraufhin alle Mutanten durchzogen, bot sich bei den *ilv*- und *gln*-Genen ein gemischtes Bild. Die Gene des

Purinmetabolismus wiesen von allen signifikanten die stärkste Abweichung der Transkriptmenge auf, wobei diese bis zur Mutante C206 um das bis zu 58fache zunahm, dann weitgehend konstant blieb, in C506 wieder leicht abfiel und in C606 ein Maximum von einem bis zu 96fachen Anstieg erreichte. Die *sul*- und *ilv*- bzw. *gln*-, *arg*-, *car*- und *nrd*-Gene waren durchgehend 2 bis 5fach hoch- bzw. runterreguliert. Auch das zweite große Cluster spr0096-spr0110 (ohne spr0105) erschien bereits in C106, wurde in C206 durch die *arg*-Gene vervollständigt und bis C606 gleichbleibend bis zu 36fach weniger transkribiert. Diese Einheit, die zum Teil schon in R6_{pbp2x2349} (spr0105) und R6_{pbp2x2349pbp1a2349} (spr0101-spr0109) aufgefallen war (siehe 3.1.6), wurde aus einer seltsamen Mischung von Genen des Arginstoffwechsels, für ein putatives Bakteriocin-System und putative Transkriptionsregulatoren (Helix-Turn(Kehre) -Helix-Motiv-Proteine) gebildet. Bemerkenswert dabei war, dass eines dieser Gene (spr0106) für ein rudimentäres Transportprotein codiert, das Ähnlichkeit zu ComA des CSP-Sekretionssystems ComAB besitzt. Das und die immer wieder beobachtete Kohärenz der Regulation von Bakteriocinproduktion und Kompetenz könnten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen diesem Cluster und letzterer hindeuten. In allen sechs Mutanten waren zwei *hsdS*-Gene (spr0445 und spr0448, spr0445 und spr0446 oder spr0446 und spr0448) charakteristisch, bei denen stets eins 2 bis 7fach mehr, das andere 2 bis 4fach weniger Transkripte an den Tag legte.

Innerhalb der Mutantenreihe gab es aber auch bedeutende Veränderungen, wie das Erscheinen und Verschwinden der Gen-Gruppen des Kompetenz-Regulons (blau) (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000), CiaRH-Systeme (rot) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002), der Bakteriocine (lila) (de Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007; Reichmann und Hakenbeck, 2000), des Kohlenstoffmetabolismus (braun), Glycero(phospho)lipidmetabolismus (gelb), der (ABC-) Transporter (orange) und Hitzeschock- bzw. Stressproteine. Abgesehen von den vermutlich mit Bakteriocinproduktion und -immunität assoziierten Genen spr0096 bis spr0110 und dem 2fach runterregulierten früh CSP-induzierten Kompetenzgen spr0106 in Mutante C106, tauchte zum ersten Mal das Kompetenzcluster und die damit einhergehenden Bakteriocingene inklusive einem in 3.1.6.1 schon eingeführten 4 bis 8fach hochregulierten Immunitätssystem (spr1800-spr1802) auf der zweiten Stufe mit einer 2 bis 4fachen Repression der Transkription auf. Diese betraf jedoch nur die früh und spät CSP-induzierten Gene, die CSP-reprimierten (spr0264, spr0265, *sulA* (spr0266), *sulB* (spr0267), *sulC* (spr0268), *sulD* (spr0269), *glnQ* (spr1121), *guaC* (spr1128)) zeigten bis auf eines ein 3 bis 13fach höheres Transkriptmengenverhältnis. Der Abfall bzw. Anstieg der Expression der CSP-induzierten bzw. -reprimierten Kompetenzgene wurde auf der dritten Stufe noch verstärkt; gleichzeitig schlossen sich weitere früh, spät und sogar verzögert CSP-induzierte an. In C406 verschwanden die Bakteriocin- und Kompetenzgene fast wieder vollständig. Hier konnte wie in den Mutanten R6_{pbp2xT338G} (siehe 3.1.6) und C106 lediglich ein einziges

2fach runterreguliertes früh CSP-induziertes Gen (spr0106), ansonsten ausschließlich 3 bis 18fach mehr bzw. 3 bis 6fach weniger transkribierte CSP-reprimierte (spr0264, spr0265, *sula* (spr0266), *sulB* (spr0267), *sulC* (spr0268), *sulD* (spr0269), *guaC* (spr1128)) bzw. verzögert CSP-induzierte (*ciaR* (spr0707), *ciaH* (spr0708), spr0931, *sphtra* (spr2045), *spo0J* (spr2046)) Gene detektiert werden. Abermals handelte es sich nicht um „typische“ Kompetenzgene, sondern um solche, deren Produkte mit dem Metabolismus verknüpft sind (siehe 3.1.6.1). Ähnlich verhielt es sich mit Mutante C506; in C606 hingegen trat das komplette Spektrum an früh, spät CSP-induzierten und CSP-reprimierten Genen fast gänzlich wieder in Erscheinung. Auf dieser Stufe waren die Kompetenz- und Bakteriocingene im Vergleich zur C306-Mutante, in der sie zum letzten Mal in einem solchen Umfang als signifikant erfasst wurden, noch stärker differentiell exprimiert. Wie auch schon in früheren Transkriptomanalysen (siehe 3.1.6) konstatiert, konnte kein Effekt von CiaRH auf die Kompetenz, sondern eher ein Effekt der Kompetenz auf CiaRH ausgemacht werden. So war kein einziges Cia-abhängiges Gen in den Mutanten C106 und C206, in denen bereits eine Abnahme der Transkriptionsrate der Kompetenzgene einsetzte, signifikant. In der folgenden Mutante wurden immerhin drei Gene dieses Regulons ermittelt (spr0931, *sphtra* (spr2045), *spo0J* (spr2046)), die in C406 sogar auf neun anstiegen (*ciaR* (spr0707), *ciaH* (spr0708), spr0782, spr0931, *malP* (spr1916), *malM* (spr1917), *axe1* (spr1538), *sphtra* (spr2045), *spo0J* (spr2046)). Von diesen lagen bis zu 2fach (C306) bzw. 7fach (C406) weniger Transkripte verglichen mit der Referenz vor, was völlig im Widerspruch zu einer negativen Regulation der Kompetenz durch CiaRH stand. Was die Mutanten C506 und C606 anbelangte, so machte sich in ersterer abermals kein Gen dieses Zwei-Komponenten-Systems bemerkbar, wohingegen in letzterer spr0782 mit einem 2fach erhöhten Transkriptmengenverhältnis anzutreffen war. Hier wurde auch aus den in den meisten Fällen zwischen eins und zwei liegenden Werten der übrigen Cia-abhängigen Gene eine Tendenz zur Steigerung der Genexpression ersichtlich, dennoch wurden diese aufgrund der festgelegten Filterkriterien ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$) nicht in die Liste der signifikanten aufgenommen. Da es sich hierbei um eine relativ geringfügige Veränderung handelte, bleibt eine CiaRH-bedingte Unterdrückung der Kompetenzgene in C606 dahingestellt. Die Gruppe des Kohlenstoff- und Glycero(phospho)lipidmetabolismus war insgesamt eher schwach vertreten. So äußerte sich das Cellobiose (spr0276-spr0282) (McKessar und Hakenbeck, 2007) bzw. *glp* (spr1987-1991) -Cluster lediglich in C306 und C606 (2 bis 3fach hochreguliert) bzw. C206 und C406 (2 bis 3fach runterreguliert). Bei den (ABC-) Transportern waren überwiegend Gene für die an den hervortretenden Stoffwechselwegen beteiligten Transportproteine bezeichnend. Zudem konnte ab C206 das in 3.1.6.1 dargelegte Gen für AliB (spr1382) identifiziert werden, welches 3 bis 5fach mehr transkribiert wurde. Die letzte Stufe der C006-Familie stellte insofern eine Besonderheit dar, da es hier zu einer Anhäufung zahlreicher bis dato nicht sichtbarer Gen-Cluster, sowie zu einer teilweise, verglichen mit den Vorgängermutanten, entgegengesetzten Regulation einzelner Gene, (spr0096, *bglA* (spr0276)) innerhalb dieser Gruppen kam. Die Einheit der (ABC-) Transporter bzw. des

Kohlenstoffstoffmetabolismus wurde durch mehrere hochregulierte Gene für Proteine, welche an der Beförderung von zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), Phosphat und Oligopeptiden beteiligt waren bzw. durch die Cluster spr0504-spr0506, spr1640-spr1652 und spr1936-spr1940 erweitert. Neben diesen konnte zum ersten Mal eine bis zu 22fach höher exprimierte Gruppe von Genen nachgewiesen werden, die aus vorangegangenen Studien als nicht-Resistenz-relevant und vermutlich Stress-bedingt hervorging (Becker, 2008; Volz, 2008), das sogenannte Cytolysin (Cyl)-Operon (spr1763-1774). Dieses in *Enterococcus faecalis* nicht jedoch in *S. pneumoniae* näher charakterisierte Operon wird vermutlich durch PlcR (spr1763) reguliert und trägt in ersterem Organismus durch die Bildung, Modifizierung und Sekretion eines hämolytisch und bakteriolytisch wirkenden Zwei-Komponenten-Peptids (Cytolysin) maßgeblich zu dessen Virulenz bei (Coburn und Gilmore, 2003; Coburn *et al.*, 1999; Gilmore *et al.*, 1994; Shankar *et al.*, 2004). Aufgrund der in Blast- und Domänenanalysen gefundenen Homologien konnte in *S. pneumoniae* auf eine ähnliche Funktion geschlossen werden. Hierbei gilt anzumerken, dass Spr1772 homolog zu dem Protein LclB ist (Martínez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000), welches Immunität gegen ein in allen C006-Mutanten auffälliges putatives Lactococccen-Bakteriocin der Lactococcin 972-Familie verleiht (spr0098). Ein entscheidender Punkt war, dass in C606 und R6 vergleichbare Transkriptmengen von *pbp2x* beobachtet wurden, sodass die in dieser Mutante vorhandene verringerte Menge



an PBP2x nicht aus Effekten auf die Transkriptionseffizienz resultierte, sondern posttranskriptioneller oder -translationeller Natur war (Peters, 2009). Trotz des hierfür offensichtlich verantwortlichen HtrA-Proteins konnte zwar eine Tendenz zur Steigerung, aber keine signifikante Transkription des entsprechenden Gens festgestellt werden.

Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von $N=40$.

Legende siehe Seite 178.

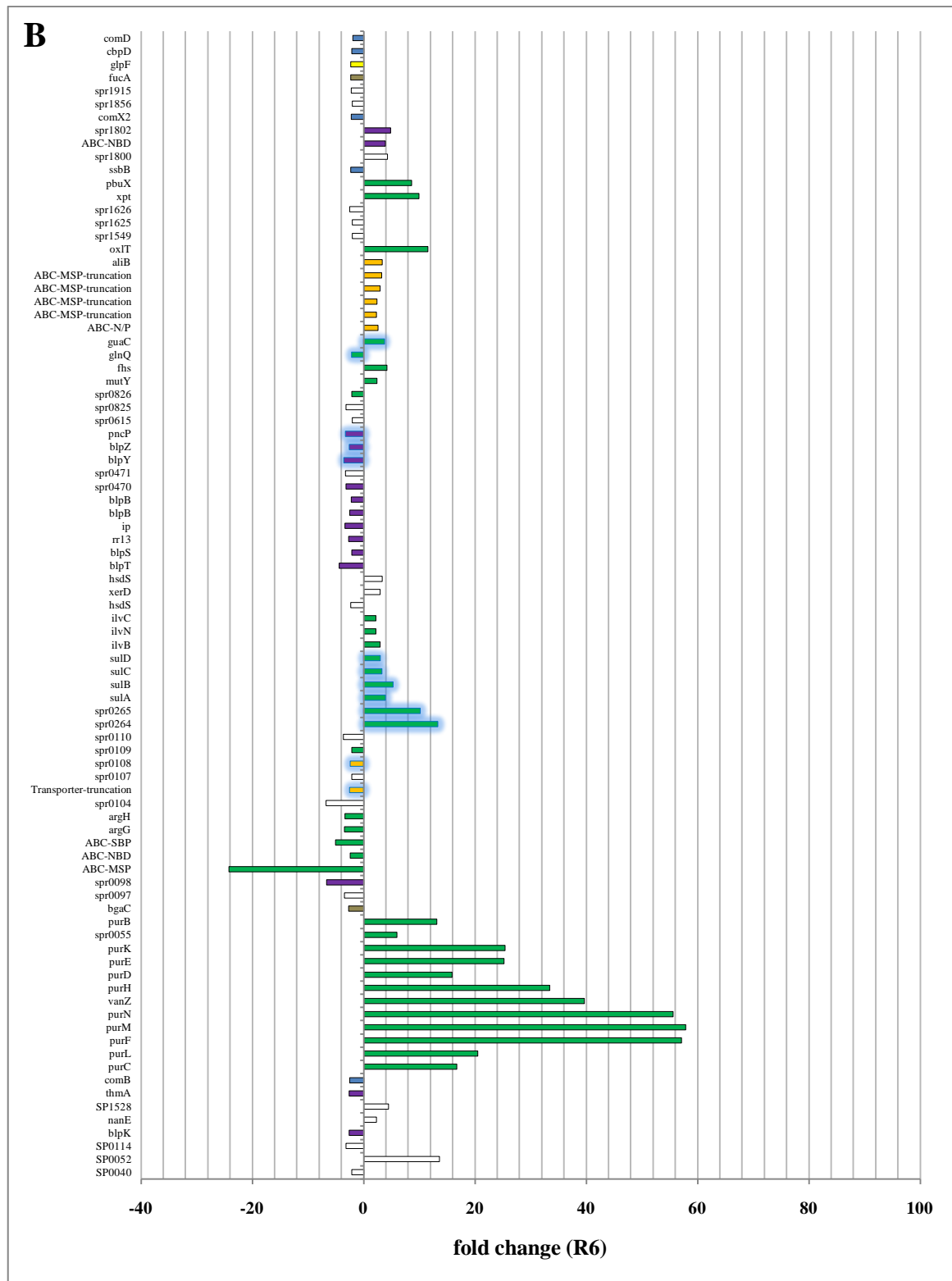


Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von $N=40$.
Legende siehe Seite 178.

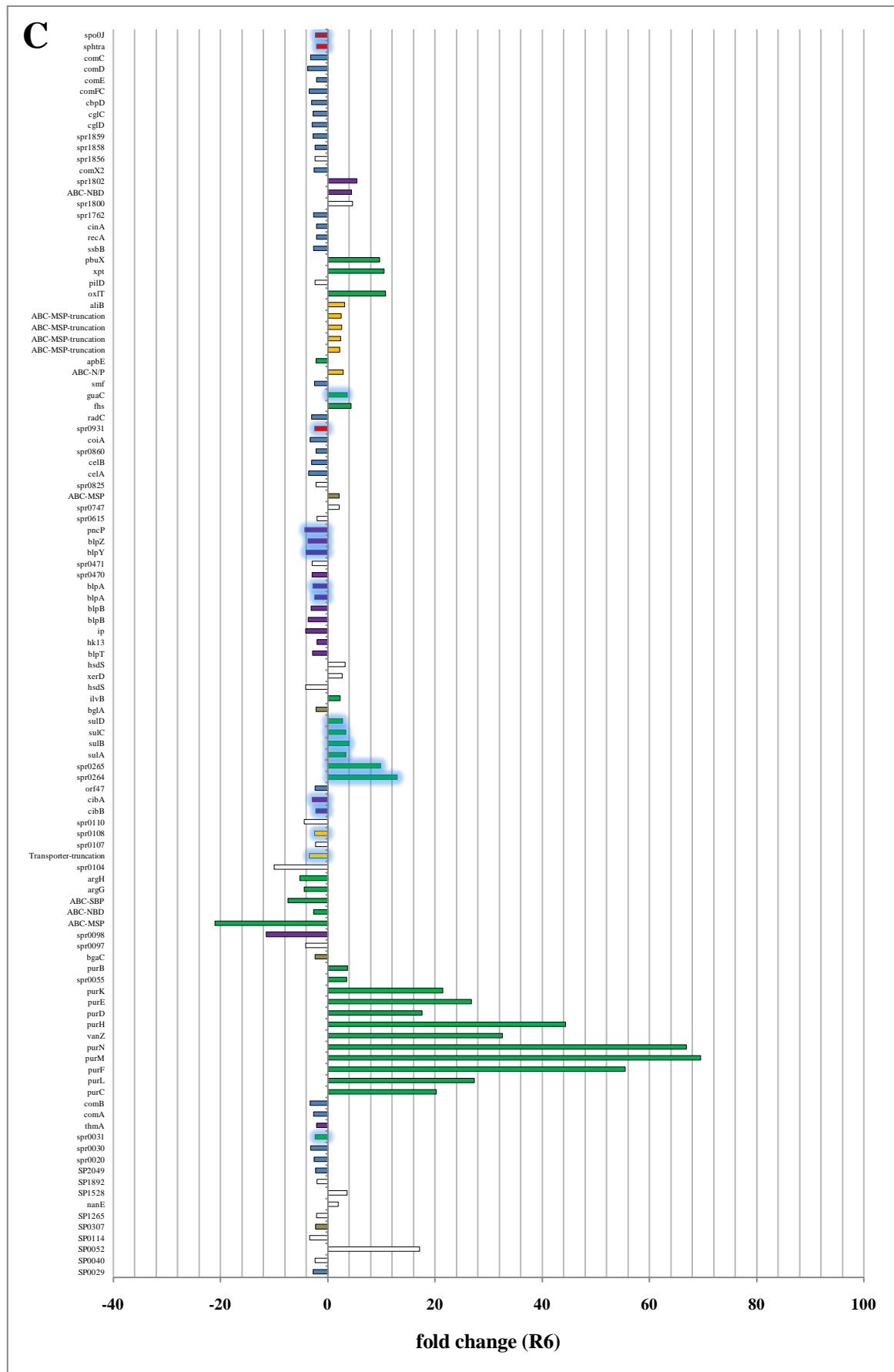


Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von $N=40$.
Legende siehe Seite 178.

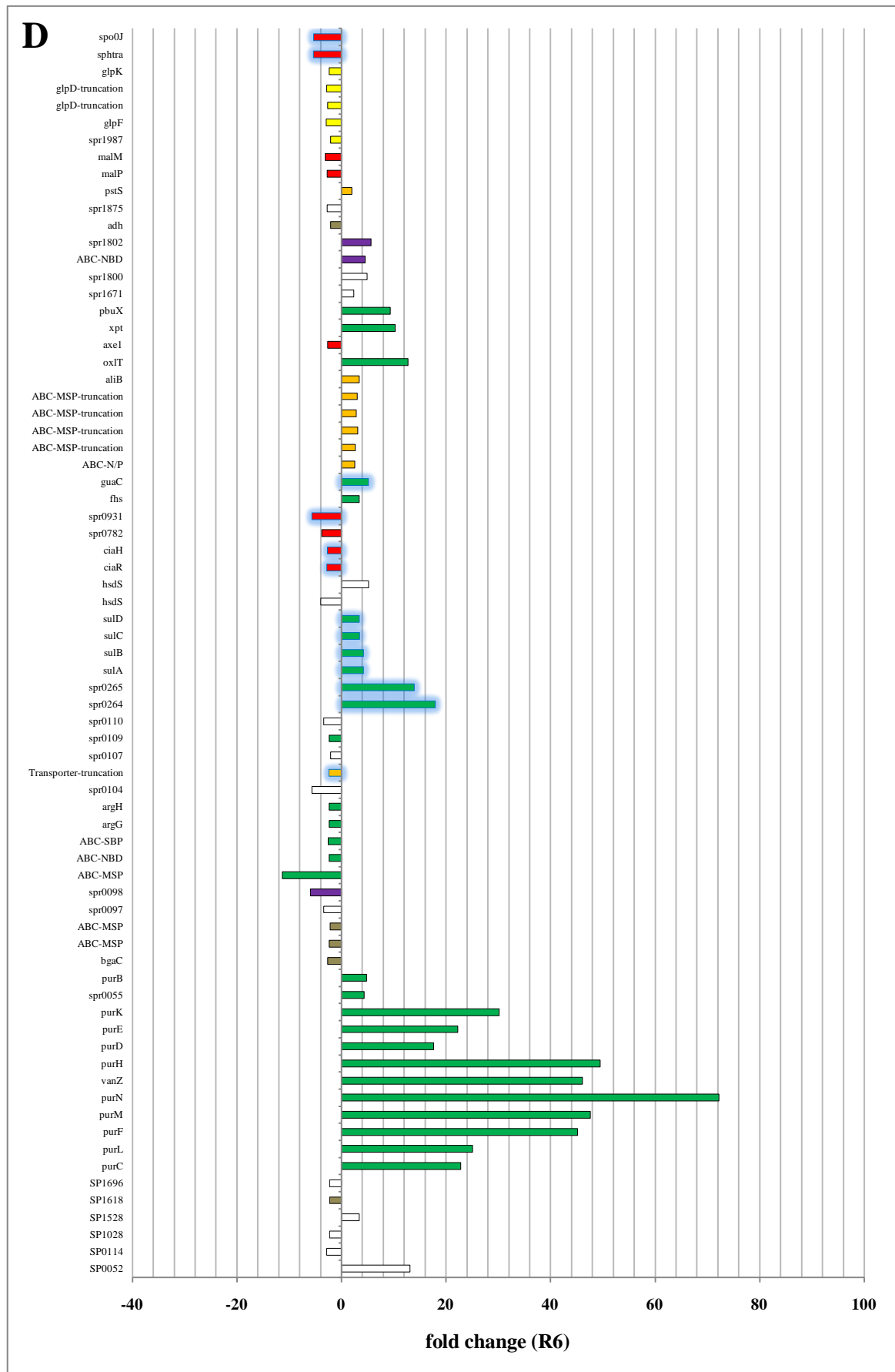


Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von $N=40$.
Legende siehe Seite 178.

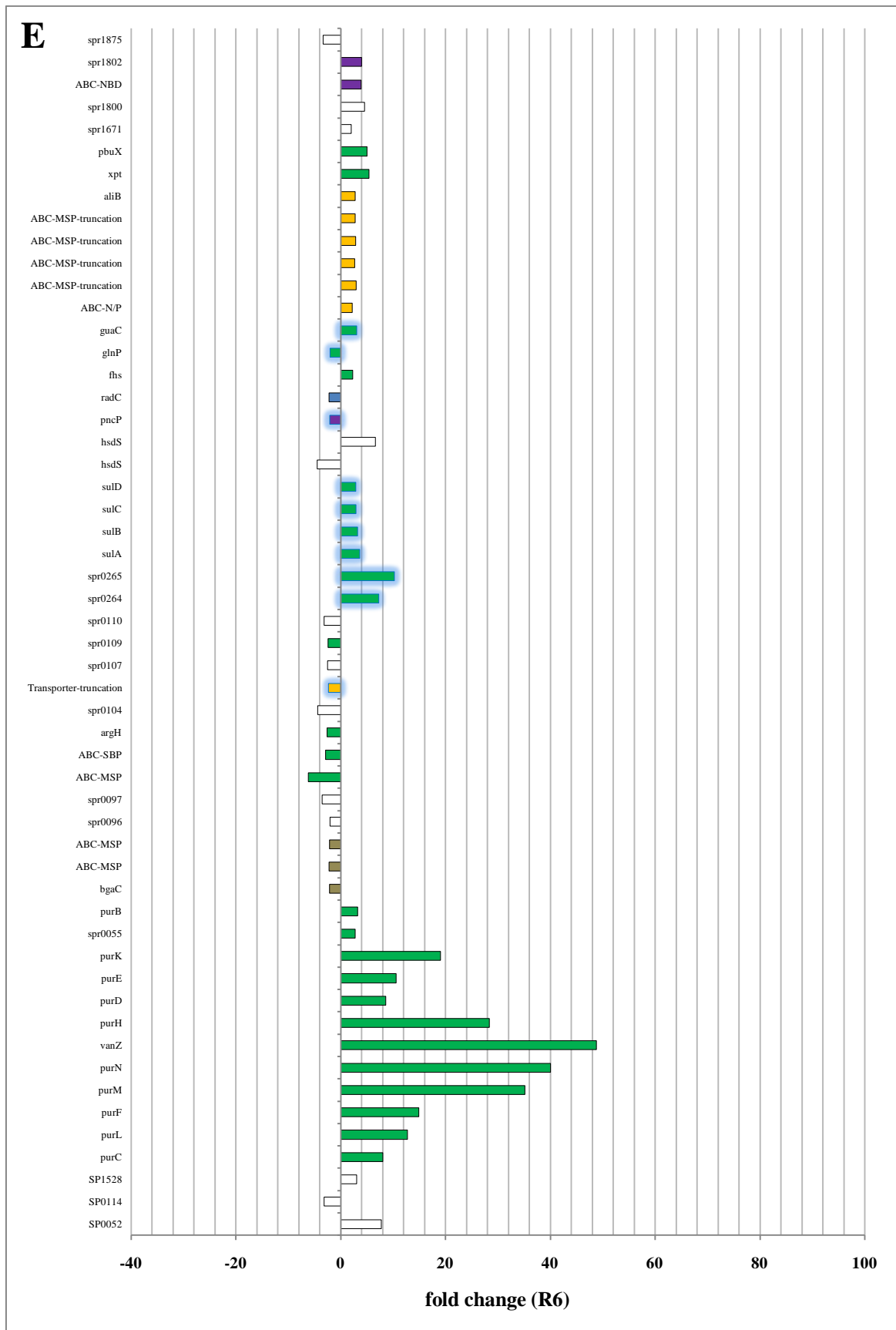


Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40.
Legende siehe Seite 178.

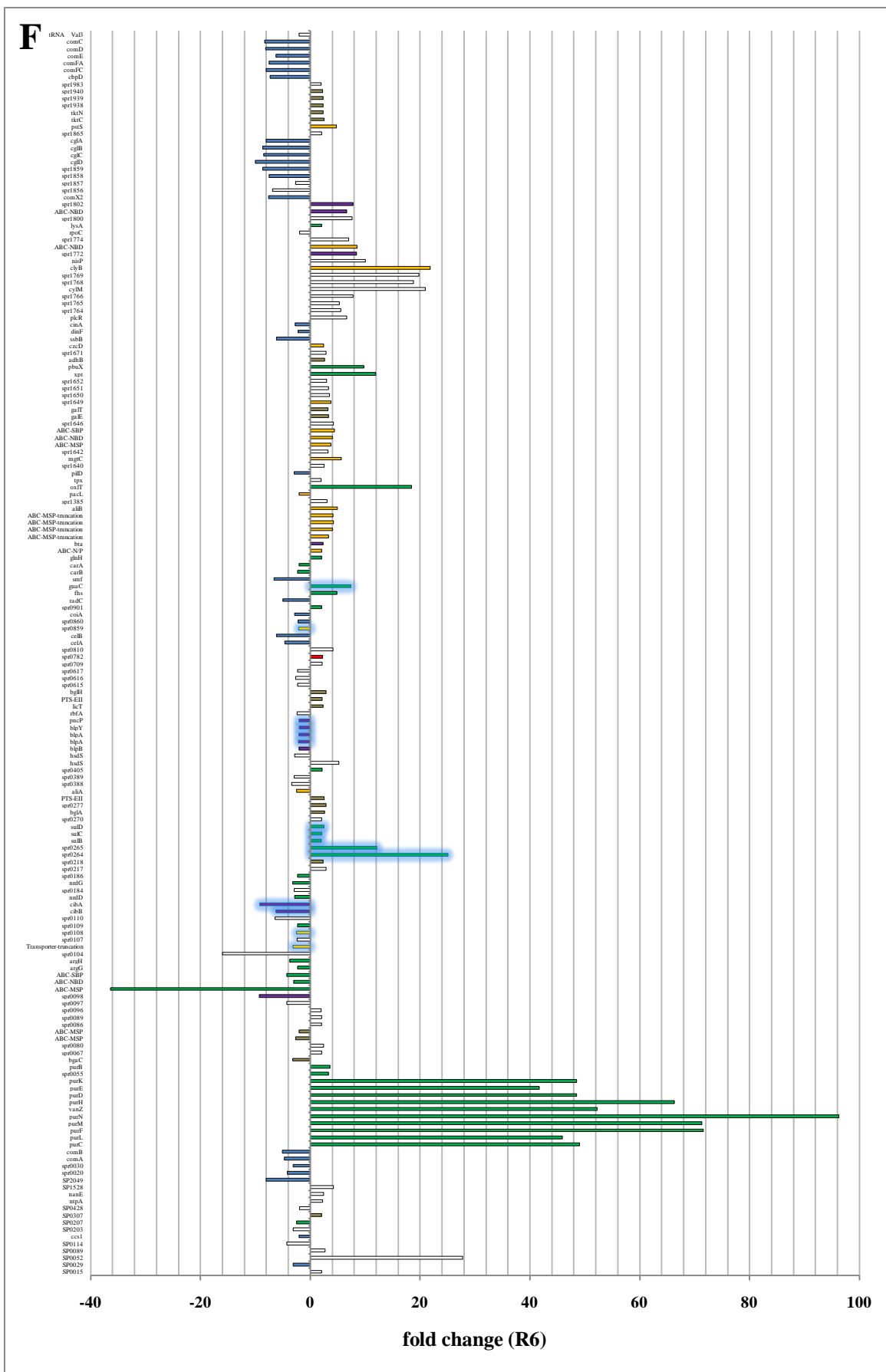


Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40. Legende siehe Seite 178.

Abb. 3.33: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene von C106 (A), C206 (B), C306 (C), C406 (D), C506 (E) und C606 (F) bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set ohne Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.5 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

3.2.1.3 Das Transkriptom der Mutante C606 bei 30 und 37 °C im Vergleich

Durch den direkten Vergleich des Transkriptionsprofils von C606 bei 30 und 37 °C sollten die möglichen transkriptionellen bzw. regulatorischen Ursachen für die bei der MHK dieser Mutante beobachtete Temperatursensitivität (siehe 3.2.1.1) gefunden werden. Hierbei wurde zur Gewinnung der Gesamt-RNA sowohl die Vor- als auch die Hauptkultur jeweils bei 30 bzw. 37 °C angezogen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in 2.7.4 beschrieben, wobei zusätzlich zum Standard-Oligonukleotid-Set die Zusatzplatte verwendet wurde. Es zeigten 115 Gene bzw. 18 intergene Regionen von den sich auf dem DNA-Chip insgesamt befindenden 2348 bzw. 488 Oligos für Gene bzw. intergene Bereiche ein signifikantes Transkriptmengenverhältnis. Die Daten der Analyse mit samt TIGR4-Homologen und Blast-Resultaten sind in Tab. 7.6 im Anhang zusammengestellt. Die Signifikanz der TIGR4-spezifischen Genen erklärte sich durch das in 3.1.6.1 Geäußerte. Da signifikante intergene Bereiche nicht analysiert wurden, wird ihnen hier auch keine weitere Beachtung geschenkt.

Es konnte beinahe das komplette Spektrum der zuvor beschriebenen Gen-Gruppen detektiert werden (Abb. 3.34). Die Kompetenz- (blau) (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000), sowie die in ihrer Transkription korrelierenden Bakteriocingene (lila) (de Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007; Reichmann und Hakenbeck, 2000) waren womöglich als Stressantwort auf die erhöhte Temperatur durchweg 2 bis 24fach hochreguliert. Diese Kompetenzgene konnten den früh, spät und verzögert CSP-induzierten Genen zugerechnet werden. Eine Ausnahme bildete eine kleine Gruppe von ausschließlich verzögert CSP-induzierten Genen (*hrcA* (spr0453), *grpE* (spr0454), *dnaK* (spr0455), *dnaJ* (spr0456)), die 2 bis 3fach weniger transkribiert wurden und für Hitzeschock- und Stressproteine codieren (Jayaraman *et al.*, 1997).

Abb. 3.34: Das Transkriptom von C606 bei einer Zelldichte von N=40 bei 30 und 37 °C im Vergleich.

Dargestellt ist die fold change zu C606 bei 30 °C der Gene von C606 bei 37 °C bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei 30 bzw. 37 °C Inkubation und einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.6 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

Auch hier konnte kein regulierender Einfluss von CiaRH (rot) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002), welches mit den 2 bis 4fach stärker exprimierten Genen spr0782, spr0931, *sphtra* (spr2045) und *spo0J* (spr2046) vertreten war, festgestellt werden. Innerhalb der Gruppe des Stickstoffmetabolismus (grün) war überraschenderweise kein einziges Gen des in den vorherigen Transkriptomanalysen stets signifikanten *pur*-Operons betroffen. Demgegenüber wiesen die Gene des Pyrimidinstoffwechsels (*pyr*-Gene), die das letzte Mal in den Mutanten R6_{pbp2xT338G} und R6_{pbp2x2349pbp1a2349} (siehe 3.1.6) hervortraten, zusammen mit den bereits eingeführten *car*-Genen eine 2fach reduzierte Transkriptionsrate auf. Bei den Genen des Kohlenstoffmetabolismus (braun) konnte ein für den Transport und die Verwertung von Mannitol spezifisches Cluster (spr0356-spr0361) bzw. das Cluster spr1936-spr1940 mit einer 2 bis 4fach verringerten bzw. 3 fach gesteigerten Rate identifiziert werden. Eine 2 bis 4fach verminderte Transkriptmenge lag auch bei den Genen des Glycero(phospho)lipidstoffwechsels (gelb) vor. Im Hinblick auf (ABC-) Transportproteine (orange) fielen lediglich die 2fach runterregulierten *fat*-Gene (spr1684 und spr1687) auf, deren Produkte am Transport von Eisen beteiligt sind. Erwähnenswert ist zudem das bei 37 °C offenbar nochmals verstärkt transkribierte Gen spr0096 als Teil des Clusters spr0096-spr0110, bei dem eine mögliche Verbindung zur Kompetenz bestehen könnte.

3.2.2 Globale Transkriptomanalyse der Mutanten C301, C401, C202 und C402

In der Folge wurde die globale Transkriptomstudie auf je zwei Mitglieder der Familien C001 und C002 spontanresistenter Labormutanten (siehe 3.2) ausgeweitet. Es handelte sich hierbei um die Mutanten C301, C401, C202 und C402, die bereits zum Teil geno- und phänotypisch gut erfasst sind (Groh, 2002; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1987). Danach zeigt sich auf der ersten und dritten Stufe der aus insgesamt fünf Mutanten bestehenden C001-Familie jeweils eine PBP2x-Punktmutation; die vierte Stufe ist gekennzeichnet durch eine frühzeitige Termination von CiaH, hervorgerufen durch eine Nonsense-Mutation nach nur 25 bp im *ciaH*-Gen (Abb. 3.35). Die

für die Resistenz von C201 und C501 verantwortliche(n) Determinante(n) blieb(en) bis dato unbekannt. Die hinsichtlich der Charakterisierung des genetischen Hintergrundes besser gestellte C002-Familie setzt sich aus vier Mutanten zusammen, wobei die ersten beiden jeweils eine Substitution in CiaH, die letzten beiden eine in PBP2x aufweisen. Ein Verlust der Kompetenz tritt in diesen Familien erst auf der letzten (C001) bzw. bereits auf der ersten Stufe (C002) ein.

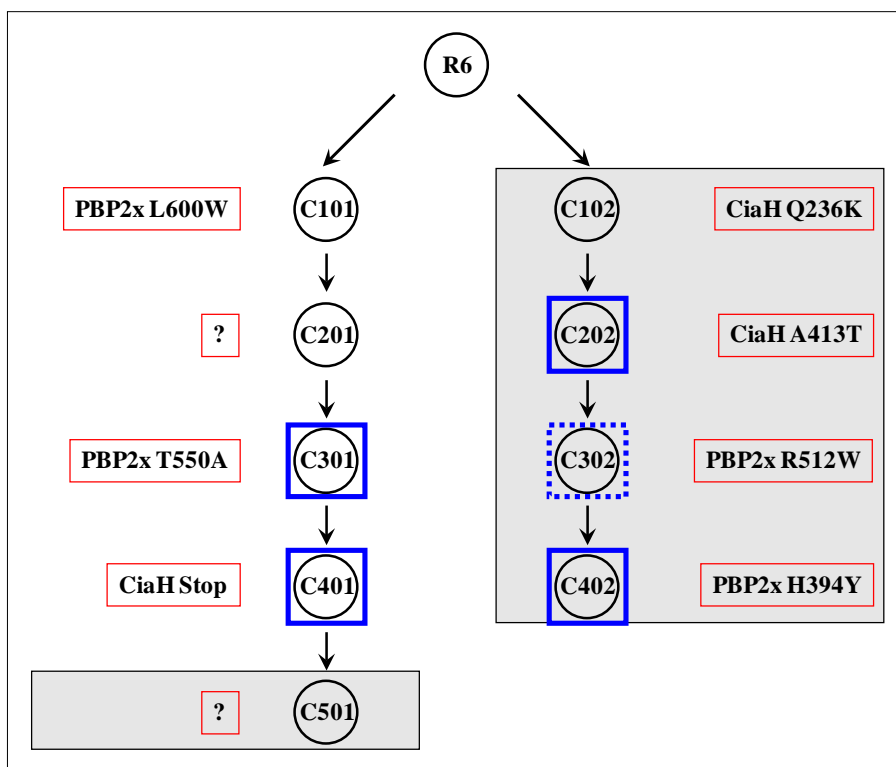


Abb. 3.35: Zusammensetzung der C001- und C002-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten.

Dargestellt ist die C001- und C002-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Mutanten und die in den einzelnen Mitgliedern identifizierte Mutationen. Ausgehend von dem β -Laktam-sensitiven Laborstamm R6 wurden unabhängige Familien von spontanresistenten Mutanten mit schrittweise steigenden Cefotaxim-Konzentrationen selektiert. Dabei ging diese Resistenzsteigerung mit einer Akkumulation von Punktmutationen einher, wobei in nahezu allen Fällen ein Selektionsschritt mit dem Auftreten einer Punktmutation in PBP2x oder CiaH korrelierte. Zudem kam es in jeder Familie ab einer bestimmten Stufe zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz. Zur Nomenklatur: C steht für Cefotaxim; die erste Ziffer gibt die Selektionsstufe an, die letzte die Familie. Die Kreise symbolisieren einzelne Mutanten, links daneben befindet sich rot umrandet die in der jeweiligen Mutante aufgetretene Mutation. Ein Fragezeichen symbolisiert eine unbekannt Mutation. Der graue Kasten verdeutlicht die in der C001-Familie auf der letzten Stufe, in der C002-Familie bereits auf der ersten Stufe zu beobachtende Kompetenzdefizienz. Die Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402 wurden jeweils durch einen blauen Kasten hervorgehoben, da sie Gegenstand der Untersuchungen waren. Die Mutante C302 ist mit einem punktierten Kasten umrandet, da sie nicht wie die übrigen Mutanten in die Transkriptomanalyse aufgenommen, sondern lediglich phänotypisch charakterisiert wurde, um je nach Ausfall der Transkriptomdaten später miteinbezogen zu werden.

Die Analyse des Transkriptionsprofils von C301, C401, C202 und C402 war aus den nachstehenden Gründen von Interesse. Wie in der C006-Familie trafen auch hier PBP2x- und CiaH-Mutationen aufeinander, was wiederum eine Bezugnahme von PBP2x zu CiaRH erlaubte. Von Vorteil war auch, dass in der C001- die C006er, in der C002-Serie dagegen die umgekehrte Reihenfolge der Einführung von Mutationen (PBP2x, dann CiaH versus CiaH, dann PBP2x) gegeben war, gleichzeitig jedoch unterschiedliche PBP2x-Austausche innerhalb den ersten beiden Serien angetroffen wurden. Dadurch wurde sowohl ein Vergleich der durch das Auftreten eines modifizierten PBP2x zu verschiedenen Zeitpunkten der Resistenzentwicklung, als auch der durch verschiedene Mutationen in diesem Gen bewirkten Effekte ermöglicht. Was CiaRH betraf, so stellte die Situation der C001-Familie mit dem CiaH-Stop in C401 einen Spezialfall dar, der durch den einhergehenden starken Anstieg der Cefotaxim-Resistenz die beiden Mutanten C301 und C401 zu einem interessanten Untersuchungsobjekt machte. Zudem warf eine in C202 gemessene ausgeprägte Aktivierung der von CiaRH regulierten Promotoren (Müller, persönliche Mitteilung) die Frage nach der Rolle der in den nachfolgenden Mutanten beobachteten PBP2x-Substitutionen auf. Schließlich rückten C301, C401 und C402 durch den Besitz der auch in klinischen Pneumokokken-Isolaten identifizierten PBP2x-Substitutionen T550A und H394Y in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Erstere war aufgrund der durch sie vermittelten außergewöhnlich hohen Cefotaxim-Resistenz, aber parallel sich äußernden Penicillin-Hypersensitivität kennzeichnend (siehe 3.1.4.2) (Asahi *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991; McDougal *et al.*, 1995; Mouz *et al.*, 1999; Sifaoui *et al.*, 1996).

Zur Bestätigung bzw. Ergänzung der entsprechenden Geno- und Phänotypen sollte zunächst einmal eine Sequenzierung und Untersuchung des Wachstums- und Resistenzverhaltens von C301, C401, C202, C302 und C402 erfolgen. Die Mutante C302 wurde ebenfalls überprüft, da diese je nach Ausfall der Transkriptomdaten gegebenenfalls in die Analysen miteinbezogen werden sollte.

3.2.2.1 Wachstumsverhalten und Cefotaxim-Resistenz der Mutanten C301, C401, C202 und C402

Durch die Sequenzierung von *pbp2x*, *ciaH* und *pbp2a* der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402 konnten die beschriebenen Mutationen verifiziert bzw. die Anwesenheit unerwünschter ausgeschlossen werden. In den entsprechenden Genen von C301 und C401 wurden keine weiteren Veränderungen festgestellt, die für die höhere Resistenz auf der zweiten Stufe dieser Familie verantwortlich sein könnten. Die Dokumentation des Wachstumsverhaltens in C-Medium ergab, dass alle Mutanten bezüglich Generationszeit und maximal erreichter Nephelo gegenüber R6 beeinträchtigt waren (Abb. 3.36 und Tab. 3.10). Hinsichtlich der Dauer der stationären Phase jedoch waren C301 und C401 dem Wildtyp gleichgestellt (5 h), die C002-Stämme sogar weit überlegen (> 5-6 h). Letztere zeigten mit einer insgesamt höheren Generationszeit und niedrigeren finalen Zelldichte eine stärkere Beeinträchtigung des Wachstums als erstere.

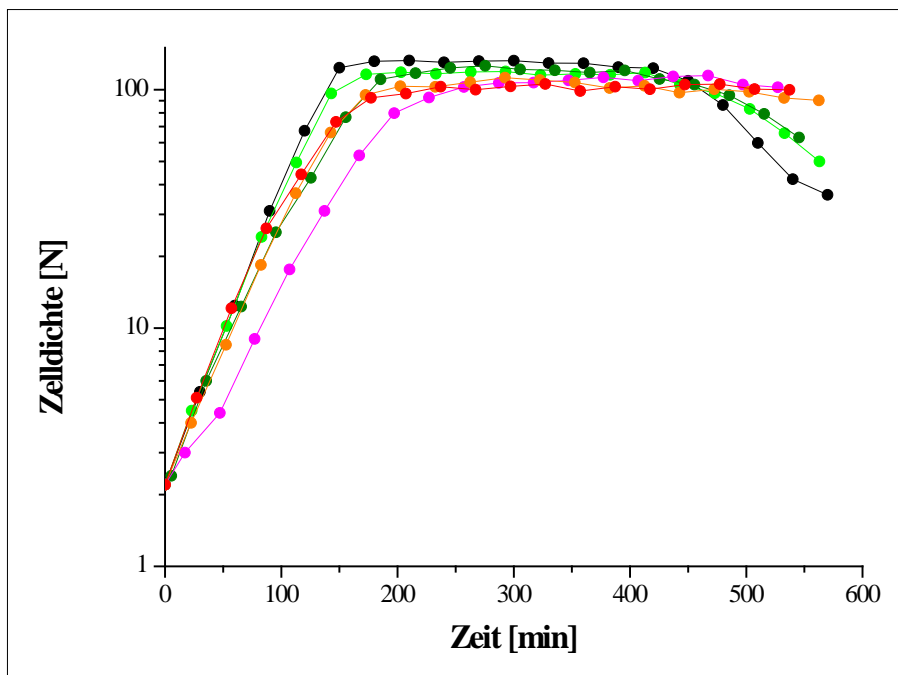


Abb. 3.36: Wachstum der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.

Dargestellt ist das Wachstum von C301, C401, C202, C402 und zum Vergleich von R6. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Gezeigt sind die Daten einer Einzel-Messung, repräsentativ für die in Tab. 3.10 aufgeführten Daten. Die Zelldichte ist in Nephelo-Einheiten (N) angegeben. Kurven: schwarz: R6; hellgrün: C301; dunkelgrün: C401; rosa: C202; orange: C302; rot: C402.

Tab. 3.10: Daten zum Wachstum der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.

Der Tabelle ist die Generationszeit, maximale Zelldichte in der stationären Phase sowie die Länge der stationären Phase von C301, C401, C202, C302, C402 und zum Vergleich von R6 zu entnehmen. Zur Generierung der Daten wurden 10 ml C-Medium 1:20 mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und das Wachstum über die Messung der Lichtstreuung mithilfe eines Nephelometers alle 30 min dokumentiert. Aufgeführt sind die gerundeten Mittelwerte aus drei unabhängigen Wachstumsmessungen.

Stamm	Generationszeit [min]	maximale Zelldichte [N]	Dauer der stationären Phase [h]
R6	24	131	5,0
C301	27	113	5,0
C401	34	121	5,0
C202	42	107	> 5,0
C302	31	106	6,0
C402	36	100	> 6,0

Die Bestimmung der MHK wurde aufgrund der in anderen Familien beobachteten Temperatursensitivität (C005- und C006-Familie) und bisher unzulänglicher Charakterisierung der vorliegenden Mutanten sowohl bei 37 als auch 30 °C durchgeführt.

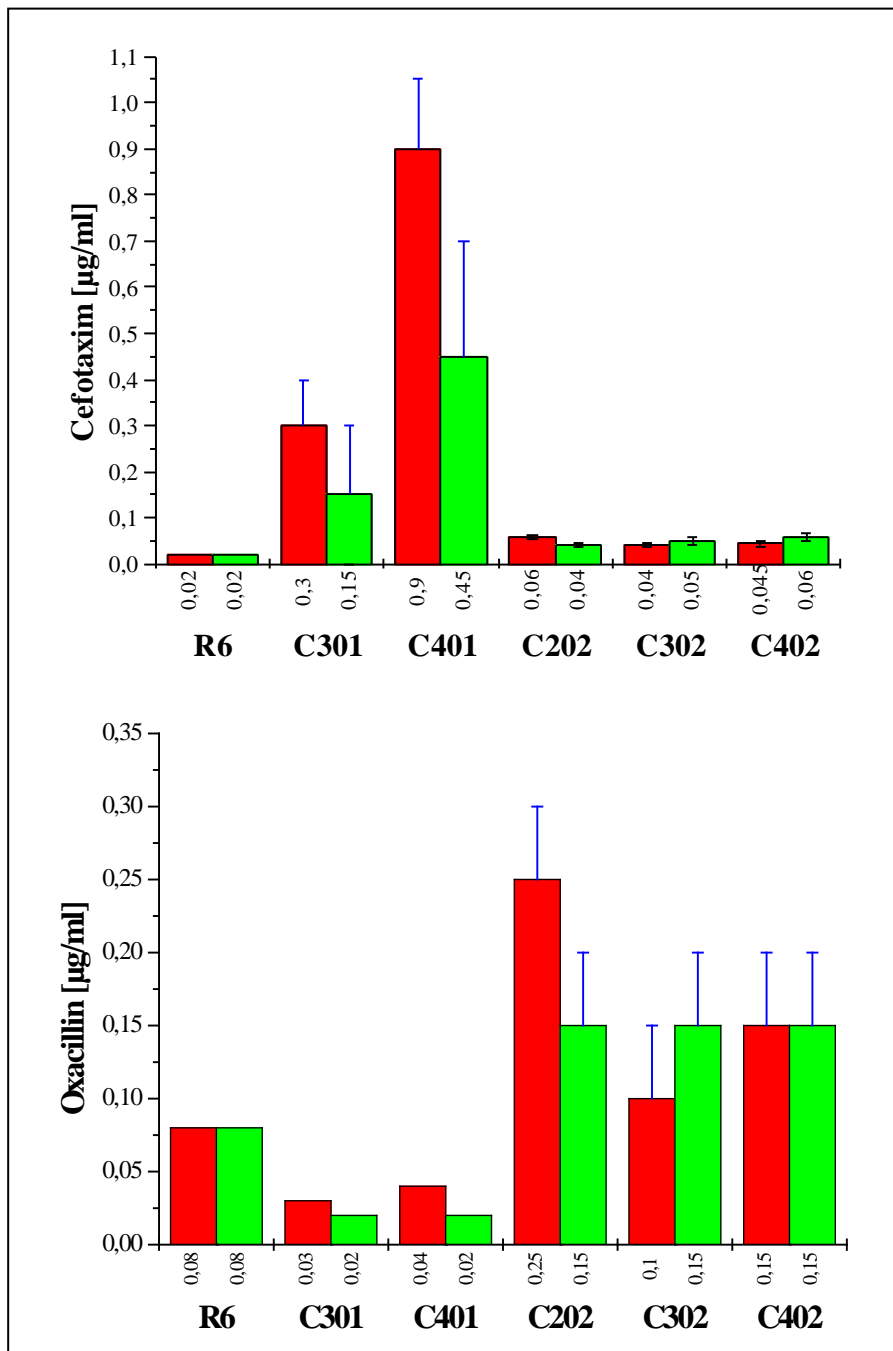


Abb. 3.37: Cefotaxim- und Oxacillin-Resistenz der Mutanten C301, C401, C202, C302 und C402.

Die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für Cefotaxim (oben) und Oxacillin (unten) von C301, C401, C202, C302, C402 und zum Vergleich von R6 sind als grüne und rote Säulen dargestellt. Die Abstufung der Antibiotika-Konzentrationen erfolgte bis zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml in 0,01er, ab 0,1 µg/ml in 0,05er und ab 1,3 (Cefotaxim)/0,5 (Oxacillin) µg/ml in 0,1er [µg/ml] Schritten. Die MHK wurde jeweils nach 24 und 48 h Inkubation bei 30 und 37 °C abgelesen, wobei die Mittelwerte (Cefotaxim)/MHK-Werte (Oxacillin) (bei 0,01er Abstufung) bzw. -Bereiche (bei 0,05er und 0,1er Abstufung) aus vier (Cefotaxim)/einer (Oxacillin) unabhängigen Bestimmung(en) nach 48 h Inkubation gezeigt sind. Dabei geben die schwarzen Balken die Standardabweichung an, die blauen Balken die Bereiche, in denen sich die MHK befindet. Die Zahlen am Boden der Säulen zeigen den entsprechenden gerundeten Mittelwert (Cefotaxim)/MHK-Wert (Oxacillin) bzw. Beginn des MHK-Bereichs an. Grüne Säulen symbolisieren eine Inkubation bei 30 °C, rote Säulen bei 37 °C.

Bei der Einführung des CiaH-Stops von C301 zu C401 kam es bei beiden Temperaturen zu der eingangs erwähnten gravierenden Cefotaxim-Resistenz-Zunahme (siehe 3.2.2), welche allerdings bei 37 °C wesentlich größer ausfiel als bei 30 °C (Abb. 3.37). In C301 und C401 manifestierte sich also genau der umgekehrte Temperatursensitivitäts-Phänotyp wie in C606 (siehe 3.2.1.1). Zudem wurde die durch die T550A-Substitution insgesamt stark ausgeprägte Cefotaxim-Resistenz aber gleichzeitige Hypersensitivität gegenüber Penicillinen, wie dem Oxacillin, in beiden Mutanten bestätigt (Abb. 3.37) (siehe 3.1.4.2 und 3.2.2). Trotz niedriger Werte machte sich auch bei diesem β -Laktam die Temperatursensitivität bemerkbar. Die C002-Reihe wies mit einer Cefotaxim-MHK im Bereich von 0,04 bis 0,06 $\mu\text{g/ml}$ eine nur geringe Resistenz bzw. Erhöhung derselbigen auf; die MHK für Oxacillin stieg dafür aber in der Mutante C202, welche den höchsten Resistenzanstieg von allen drei an den Tag legte, 3 bis 4fach. Obendrein fiel bei diesen Mutanten eine leichte Sensitivität im Bezug auf die Temperatur auf. So war insbesondere in C202 bei 37 °C eine höhere Cefotaxim- und Oxacillin-Resistenz zu verzeichnen als bei 30 °C.

3.2.2.2 Das Transkriptom der Mutanten C301, C401, C202 und C402

Zur Untersuchung des Transkriptionsmusters der Mutanten C301, C401, C202 und C402 wurde die Gesamt-RNA aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von 40 präpariert. Bei dieser Nephelo war durch Vorversuche sichergestellt (siehe 3.2.2.1), dass alle Stämme logarithmisches Wachstum aufwiesen. Für C301 und C401 wurde ein signifikantes Transkriptmengenverhältnis von $\text{AVG} \geq 2$ oder $\leq 0,5$ festgelegt, für C202 und C402 mußte aufgrund der gewaltigen Datenmenge die AVG auf 3 oder $\leq 0,33$ gesetzt werden. Zusätzlich äußerte sich die Signifikanz eines Gens durch einen angepassten P-Wert von $\leq 0,01$ (1 %) und eine FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Durch dreimalige Wiederholung der Experimente (Replicate spots, Dye-swap und Biological replicates) sollten idealerweise insgesamt acht Werte pro Gen anfallen, welche zusammen ausgewertet wurden. Verwendet wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte. Die Ergebnisse des Vergleichs der jeweiligen Mutanten-Transkriptome mit dem von R6 sind in Tab. 7.7 (C301 und C401) und Tab. 7.8 (C202 und C402) im Anhang aufgeführt. Die in 3.1.6 und 3.2.1 angesprochenen Gen-Cluster konnten größtenteils abgesteckt werden. In Abb. 3.38, Abb. 3.39 (C301 und C401), Abb. 3.40 und Abb. 3.41 (C202 und C402) findet sich eine Darstellung der nach diesen Clustern zusammengefassten Transkriptome. Auch hier resultierte die Signifikanz der TIGR4-spezifischen Gene aus der starken Homologie der entsprechenden Oligos zu R6 (siehe 3.1.6.1). Signifikante intergene Regionen werden nicht weiter behandelt.

Für C301 wurden lediglich acht bzw. zwei von 2348 und 488 Oligos für Gene bzw. intergene Regionen in die Liste der signifikanten aufgenommen, da gleichsam wie in R6_{pbp2xT338G} (siehe 3.1.6.1) viele Gene wegen eines hohen P-Wertes rausfielen (Abb. 3.38). Bei der Gruppe des Stickstoffmetabolismus (grün) konnten drei *pur*-Gene identifiziert werden, die zum ersten Mal als (3 bis 7fach) runterreguliert auftraten. Zudem zeigten sich erneut die schon mehrfach dargelegten *hsdS*-

Gene spr0445 bzw. spr0446 in der gewohnten Konstellation mit einer 3fach erniedrigten bzw. erhöhten Transkriptmenge.

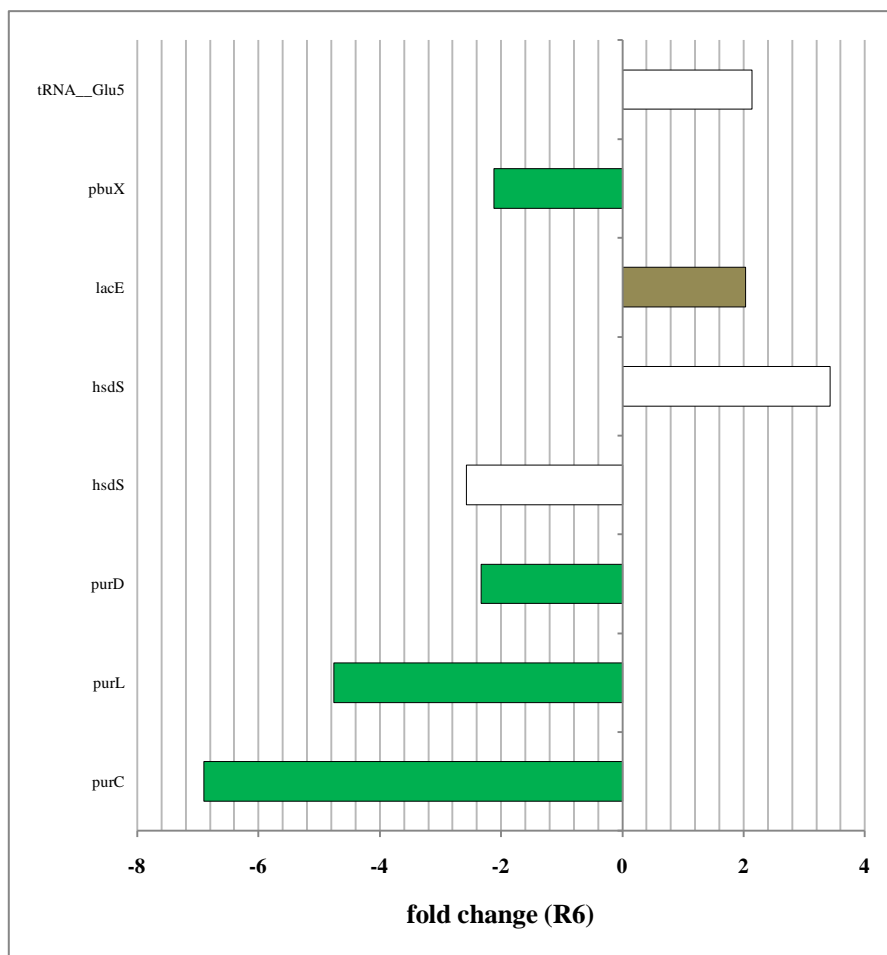


Abb. 3.38: Das Transkriptom von C301 bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene von C301 bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.7 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus.

In der Mutante C401 stieg die Anzahl der signifikanten Gene und intergenen Bereiche auf 126 bzw. 22 (Abb. 3.39). Die Kompetenzgene (blau) (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000) wurden im Gegensatz zu allen anderen bislang analysierten spontanresistenten Labormutanten 2 bis 4fach mehr (früh und spät CSP-induzierte Kompetenzgene) bzw. 2 bis 13fach weniger (CSP-reprimierte Kompetenzgene: *manN* (spr0259), *manM* (spr0260), spr0264,

guaC (spr1128), *adhE* (spr1837), spr1959) transkribiert. Hier könnte auf eine durch die frühzeitige Termination und demnach fehlende Expression von *ciaH* verursachte Derepression der Kompetenz geschlossen werden. Angesichts der aber nur geringen transkriptionellen Veränderung schien wie in C606 (siehe 3.2.1.2) ein solcher Effekt eher fraglich. Trotz des Fehlens einer funktionellen HK CiaH wurden die durch das CiaRH-Regulon (rot) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2002) negativ regulierten Gene *manN* (spr0259) und *manM* (spr0260) differentiell exprimiert, welche demnach auch noch anderweitig oder durch den intakten RR CiaR alleine kontrolliert werden. Die insgesamt nur schwach vertretenen Bakteriocingene (lila) (de Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007; Reichmann und Hakenbeck, 2000) schlossen sich mit einem 2 bis 3fach niedrigeren Transkriptmengenverhältnis nicht wie bisher der Kompetenz an. Innerhalb der Einheit des Stickstoff-, Kohlenstoff- (braun) und Glycero(phospho)lipidmetabolismus (gelb) machte sich eine vorherrschende 2 bis 13fache Reduktion der Transkriptionsrate bemerkbar. Eine Ausnahme bildeten insbesondere die gehäuft anzutreffenden Gene für Glykosyltransferasen mit 2 bis 3fach mehr Transkripten. Die Gruppe der (ABC-) Transporter (orange) bestand aus einer bunten Mischung von Genen für Proteine, welche an dem Transport von Metaboliten der oben aufgeführten Stoffwechselwege, Kationen (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) (3fach runterreguliert) und dem zuvor nicht aufgefallenen „Multidrug“- und Makrolid-Export (2fach hochreguliert) beteiligt waren. Mit *ftsW* (spr0973), *licD2* (spr1152) (Zhang *et al.*, 1999), spr1274, *pcpA* (spr1945) (Sánchez-Beato *et al.*, 1998) traten erstmalig mit Zellwand und Biosynthese derselbigen assoziierte Gene zutage, die allerdings nur moderate Veränderungen in ihrer Expression erkennen ließen. Ein besonderes Augenmerk galt dem hervorstechend hochregulierten Cluster spr1545-1549, welches mit dem Gen spr1545, das eine bis zu 350fach gesteigerte Transkription an den Tag legte, alle bis dato als signifikant evaluierten Gene in den Schatten stellte. Anhand der bei Blast-Analysen gefundenen Homologien konnten vier der fünf hypothetischen Genprodukte eine Funktion zugeordnet werden. Demnach codiert das erste (spr1545) und auffälligste der fünf Gene für ein Guanosintriphosphat (GTP) -bindendes Protein EngA, die übrigen (spr1546, spr1548 und spr1549) scheinen in den Transport eines unbekanntes Substrates involviert zu sein. In der 3'-Umgebung dieses augenscheinlichen Operons befindet sich ein weiteres für ein EngA-Protein codierendes Gen (spr1553). Das Protein EngA gehört zu der bei Bakterien weitverbreiteten und hochkonservierten Familie der GTPasen, bei denen es sich um zelluläre Regulatoren handelt, die ihre Funktion offenbar über die Interaktion mit RNA bzw. Ribosomen realisieren (Caldon und March, 2003; Caldon *et al.*, 2001). In drei der vorangegangenen Transkriptomstudien (siehe Tab. 7.4, Tab. 7.5 und Tab. 7.6 im Anhang) konnten bereits einzelne Gene bzw. TIGR4-Homologe (spr1547, spr1548, spr1549, SP1703) dieser Einheit ermittelt werden.

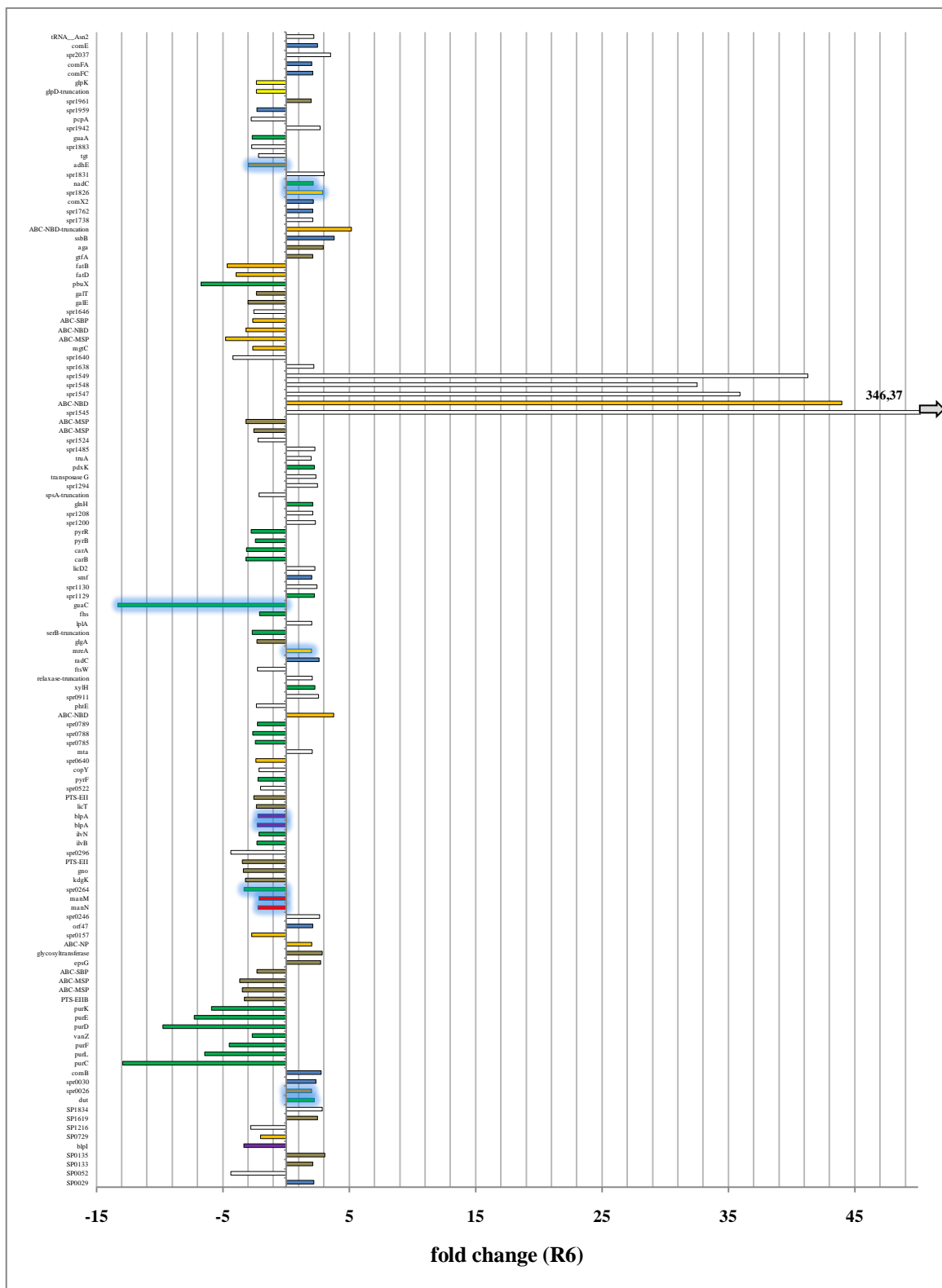


Abb. 3.39: Das Transkriptom von C401 bei einer Zelldichte von N=40. Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.39: Das Transkriptom von C401 bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene von C401 bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ od $\alpha \leq 0,5$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.7 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

Daneben traten die Gene *copY* (spr0639) und spr0640 hervor, welche mit 2fach weniger Transkripten vorlagen und vermutlich zusammen mit *ctpA* (spr0641) das sogenannte Cop-Operon bilden. Durch das Vorliegen von Homologien zu einer gut charakterisierten Transkriptionseinheit in *Enterococcus hirae* (Cobine *et al.*, 1999; Odermatt und Solioz, 1995; Reyes *et al.*, 2006; Strausak und Solioz, 1997) konnte den Genprodukten eine Rolle bei der Modulation der intrazellulären Kupferkonzentration zugesprochen werden. Ähnlich wie bei dem in 3.2.1.2 dargelegten Cyl-Operon wurde keine Resistenzrelevanz des Cop-Operons nachgewiesen (Becker, 2008), sodass auch hier von einer Stressantwort ausgegangen werden kann.

Bei Vergleich des Transkriptionsprofils von C301 und C401 (siehe Tab. 7.7 im Anhang) konnten als Gemeinsamkeit lediglich vier zum Stickstoffmetabolismus gehörige Gene ausfindig gemacht werden. Unterschiede zwischen den beiden Profilen drückten sich in dem Auftreten mehrerer Gen-Cluster in C401 aus, wobei hier hauptsächlich das der Kompetenz zu nennen ist. Der wohl entscheidendste betraf jedoch die in C301 noch nicht aufgefallene, in C401 aber stark hochregulierte Gen-Gruppe spr1545-1549. Dass diese Gene für den bei der Einführung des CiaH-Stops in C401 beobachteten beträchtlichen Resistenzanstieg verantwortlich sein könnten, war naheliegend.

Durch die erforderliche 3fache Filterung der nun folgenden Transkriptomdaten von C202 und C402 kam es zum Verlust vieler Gene, sodass einzelne Cluster zwar als signifikant in die Auswertung eingingen, sich dabei aber nur noch mit wenigen Vertretern manifestierten. Eine 2fache Filterung hätte für C202 144 Gene und 21 intergene Regionen, für C402 311 und 33 geliefert. Nach den oben genannten Filterkriterien blieben in C202 noch 59 Gene und vier intergene Bereiche, in C402 133 und 20 übrig.

In der Mutante C202 kam bei der Gruppe des Kompetenz-Regulons ein ungewöhnliches, vielleicht nicht ganz unbedeutendes Detail zum Vorschein (Abb. 3.40). Während alle anderen früh, spät, verzögert CSP-induzierte und CSP-reprimierte Kompetenzgene bis zu 12fach weniger transkribiert wurden, war bei *comB* als einziges die Transkriptmenge 3fach erhöht. Der Kompetenz entsprechend war die Transkription der Gene für Bakteriocine 5 bis 12fach reduziert.

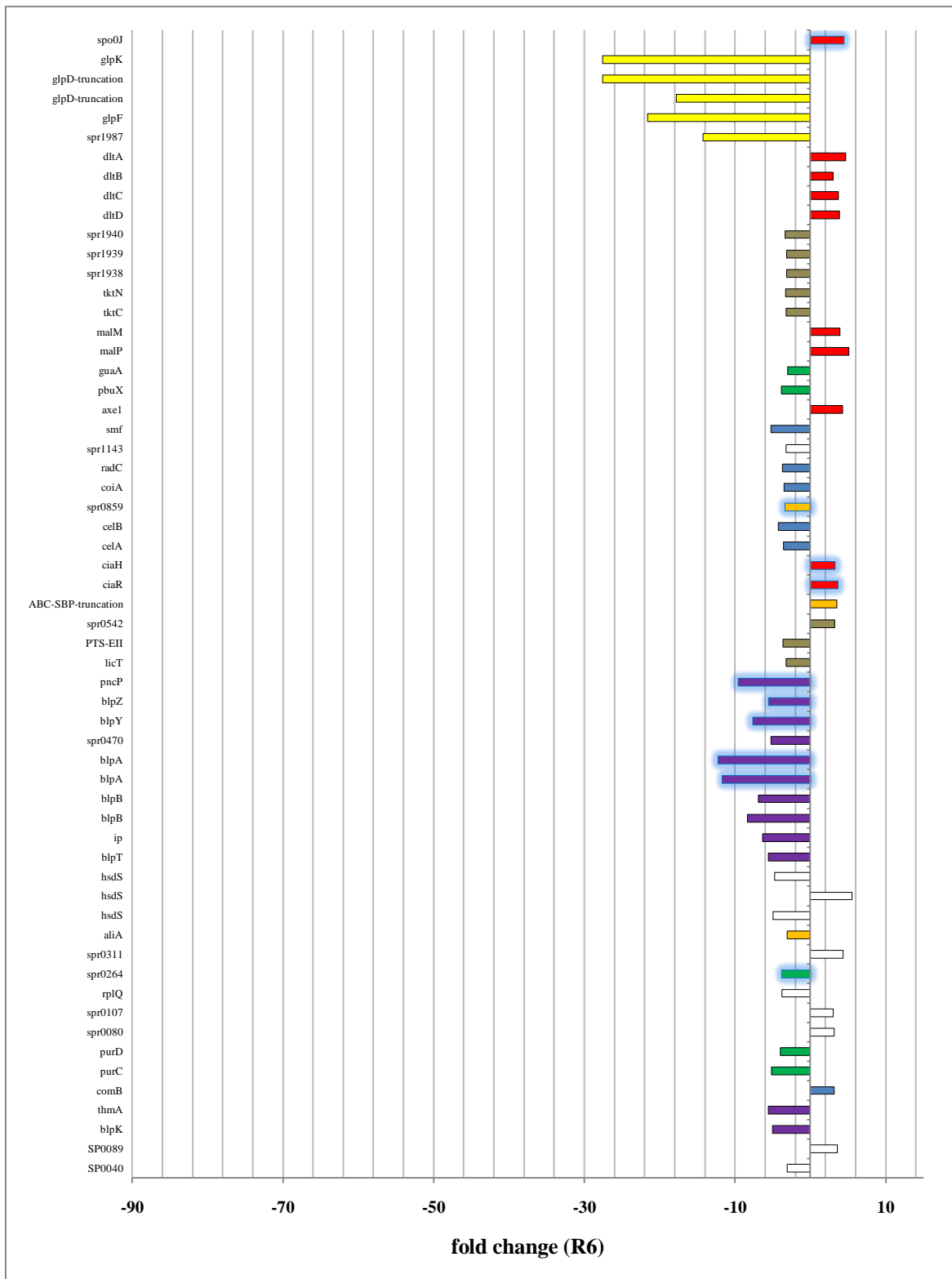


Abb. 3.40: Das Transkriptom von C202 bei einer Zelldichte von N=40.
 Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.40: Das Transkriptom von C202 bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene von C202 bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$), einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.8 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

In Übereinstimmung mit der stärkeren Aktivität der CiaRH-Promotoren in dieser Mutante konnte zum ersten Mal eine immerhin 3 bis 5fach gesteigerte Expression von zehn Genen dieses Regulons nachgewiesen werden. Bei den Genen des Stickstoff-, Kohlenstoff- und Glycero(phospho)lipidstoffwechsels waren 3 bis 28fach weniger Transkripte zu verzeichnen. Darüber hinaus erwiesen sich drei der bereits mehrfach erwähnten *hdsS*-Gene (*spr0445*, *spr0446*, *spr0448*), *aliA* (*spr0327*) und *spr0107* als signifikant.

In der Mutante C402 präsentierten sich fast alle früh, spät, verzögert CSP-induzierten und CSP-reprimierten Kompetenzgene inklusive *comB* bzw. die korrelierenden Bakteriocingene mit einem bis zu 80fach bzw. 3 bis 6fach verringerten Transkriptmengenverhältnis (Abb. 3.41). Bei dem mit elf Genen vertretenen Zwei-Komponenten-System CiaRH stellte sich eine 3 bis 11fache Verstärkung (positiv regulierte Gene) bzw. 3fache Repression (negativ regulierte Gene) der Transkription ein. Die Mehrheit der Gene des Stickstoff- und Glycero(phospho)lipidmetabolismus wurde bis zu 42fach runterreguliert vorgefunden; hiervon ausgenommen waren die 3 bis 6fach höher regulierten *gln*-Gene. Innerhalb der Gruppe des Kohlenstoffstoffwechsels und der (ABC-) Transportproteine, welche unter anderem das 3 bis 7fach vermehrt exprimierte Cellobiose-Operon (*spr0276-spr0282*) (McKessar und Hakenbeck, 2007) und überwiegend reprimierte Gene für Transporter von Metaboliten, Ionen, Eisen und Oligopeptiden (*aliB* (*spr1382*)) umfasste, war keine einheitliche Regulation ersichtlich. Nicht zuletzt fanden sich viele zuvor schon vorgestellte signifikante Einzelgene und Cluster, wie *cylM* (*spr1767*) als Teil des Cyl-Operons (*spr1763-1774*) (siehe 3.2.1.2), die Stress-induzierten Gene *spr0453* bis *spr0455* (siehe 3.2.1.3) und *hdsS* (*spr0446*).

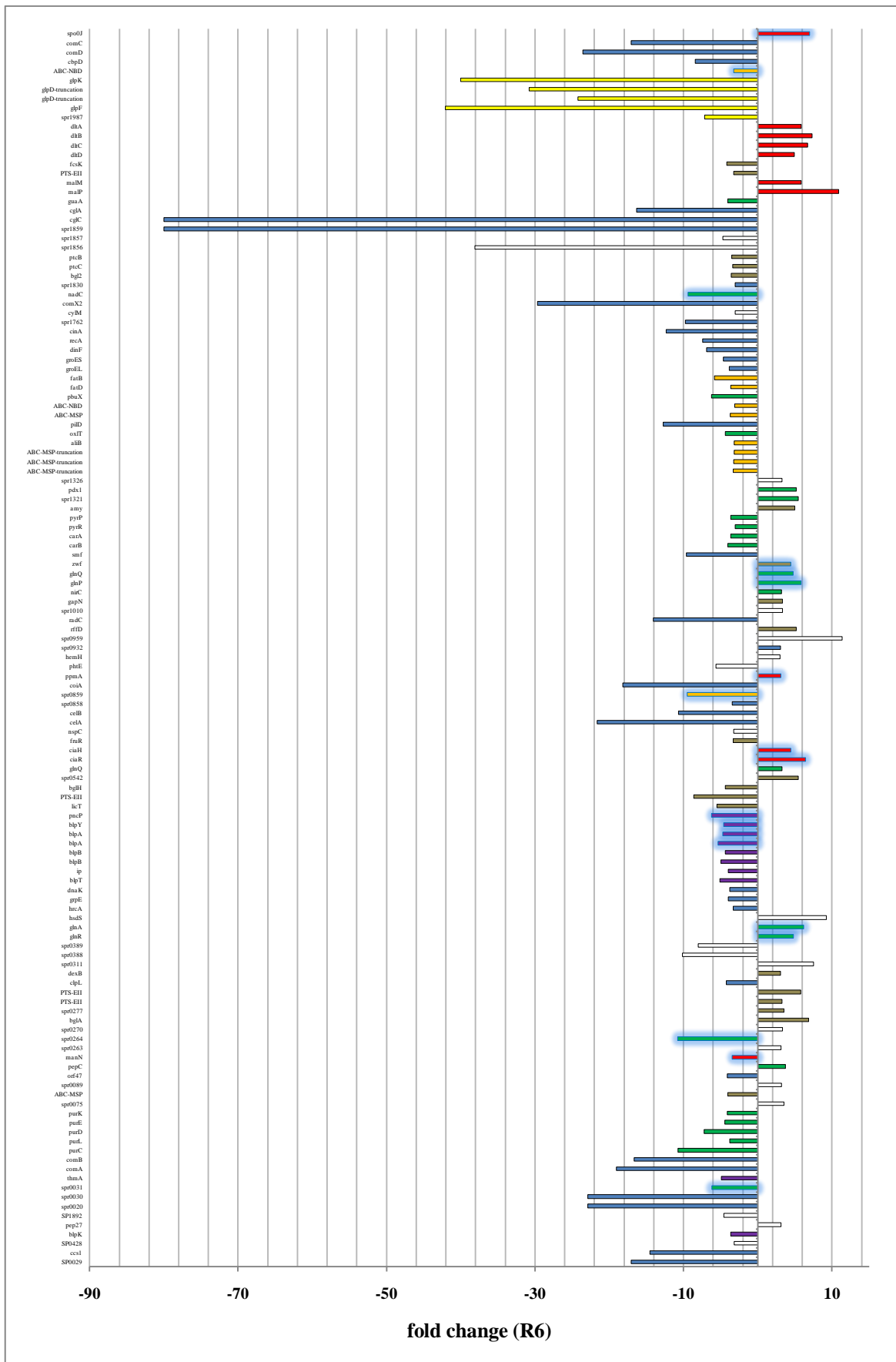


Abb. 3.41: Das Transkriptom von C402 bei einer Zelldichte von N=40. Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.41: Das Transkriptom von C402 bei einer Zelldichte von N=40.

Dargestellt ist die fold change zu R6 der Gene von C402 bei einer Zelldichte von N=40 mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von 0,05 (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinate sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Genen) aufgetragen, die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tab. 7.8 im Anhang aufgelistet. Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, nach denen die entsprechenden Balken gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter. Leuchtend-blau umrandete Balken repräsentieren Gene, welche über ihre eigene Gruppe hinaus nach Peterson *et al.*, 2004 zusätzlich noch dem Kompetenz-Regulon zugerechnet werden können („Erweitertes Kompetenz-Regulon“).

Unterschiede zwischen dem Transkriptionsmuster von C202 und C402 wurden bei der Kompetenz einschließlich Bakteriocinen, CiaRH und dem Stickstoffmetabolismus deutlich (Tab. 7.8 im Anhang). Mit der Anwesenheit der zwei PBP2x-Punktmutationen in C402 ging eine in höchstem Maße verstärkte Unterdrückung der Kompetenz- und *pur*-Gene sowie eine Zunahme der Transkriptionsrate des CiaRH-Regulons einher. Die Transkription der Bakteriocingene hingegen stieg im Vergleich zu C202 wieder an. Ferner wurde das Kompetenz-Regulon und die Gruppe des Stickstoffstoffwechsels durch zahlreiche weitere Gene ergänzt. Bezeichnend war jedoch die Tatsache, dass *comB* in C202 als einzigstes der Kompetenzgene hoch-, in C402 dagegen runterreguliert war.

Abschließend läßt sich sagen, dass die Mutanten C301, C401, C202 und C402 hinsichtlich der Regulation der dargestellten Gen-Cluster, aber auch der Präsenz einzelner Gene ein ganz anderes Verhalten offenbarten als die übrigen untersuchten Mutanten-Gruppen. Generell konnten in allen bisher durchgeführten Transkriptomanalysen die als signifikant erfassten Gene fast ausschließlich dem ComDE- und CiaRH-Regulon, der Bakteriocinproduktion und -immunität, sowie Stoffwechselfvorgängen zugeschrieben werden, die mit Virulenz, Kompetenz, Energiestatus und Zellwand- bzw. Membranintegrität assoziiert sind und auf den ersten Blick zunächst wenig mit β -Laktam-Resistenz zu tun haben.

3.3 Darstellung einer *pbp2b*-Inaktivierungs- und Deletionsmutante von *Streptococcus pneumoniae*

Zeitgleich zur Anfertigung dieser Arbeit erschien eine Publikation, in der das Gen für das PBP2b von *S. gordonii*, einem Verwandten von *S. pneumoniae*, erfolgreich inaktiviert werden konnte (Haenni *et al.*, 2006). Dieser Befund wurde zum Anlass genommen eine frühere Veröffentlichung von Kell *et al.*, 1993, in der eine Inaktivierung des *pbp2b* von *S. pneumoniae* mißlang, nochmals

kritisch zu durchleuchten. Bei genauerer Überprüfung der Vorgehensweise (Abb. 3.42) fielen zwei Unstimmigkeiten auf.

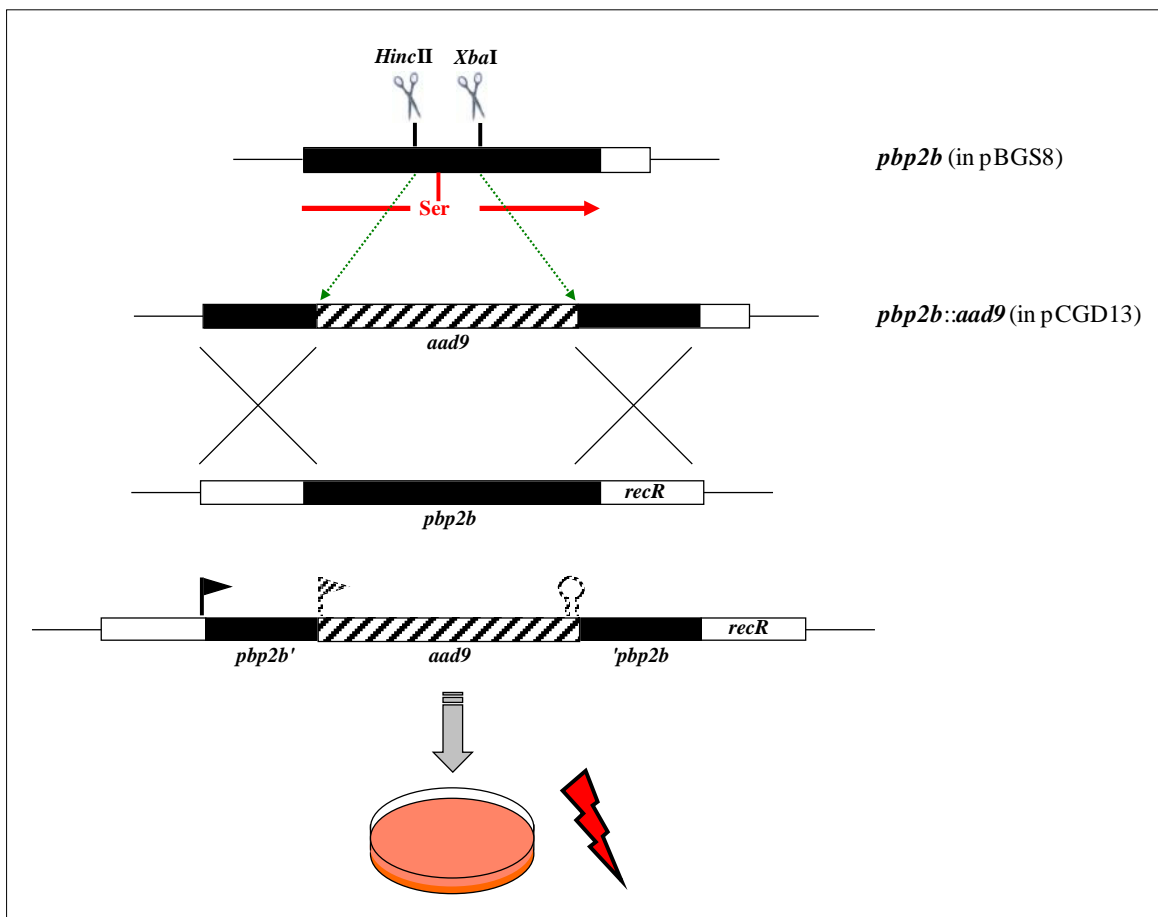


Abb. 3.42: Strategie von Kell und Mitarbeitern zur Inaktivierung von *pbp2b* in *Streptococcus pneumoniae*.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der von Kell *et al.*, 1993 verfolgten Strategie zur Konstruktion einer *pbp2b*-Inaktivierungsmutante von *S. pneumoniae*. Ein 1669 bp großes Fragment, welches Codon 195 bis 680 von PBP2b (annotiert nach Dowson *et al.*, 1989c und Pagliero *et al.*, 2004) sowie 208 bp der 3'-Umgebung von *pbp2b* einschloss, wurde in dem Vektor pBGS8 kloniert. Es folgte ein Verdau mit den Enzymen *HincII* und *XbaI*, die beidseitig des Codons 386 für das aktive Serin (annotiert nach Dowson *et al.*, 1989c und Pagliero *et al.*, 2004) schnitten, wodurch am 5'-Ende 527 bp von *pbp2b*, am 3'-Ende noch 841 bp von *pbp2b* und Umgebung zur homologen Rekombination erhalten blieben. Das linearisierte Plasmid wurde mit einem 1575 bp großen Fragment ligiert, welches das Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* aus *Enterococcus faecalis* (LeBlanc *et al.*, 1991) inklusive Promotor und Terminator beinhaltete. Eine Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit dem derart konstruierten Plasmid pCGD13 lieferte keine lebensfähigen Transformanten, weshalb eine essentielle Funktion von PBP2b angenommen wurde. Theoretisch sollte eine Transformante ein inaktiviertes *pbp2b*-Gen enthalten, bei dem ein internes von Codon 371 bis 470 reichendes und die beiden konservierten Boxen SVVK und SSN umfassendes Stück durch die Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt war. Gene sind durch Balken dargestellt (schwarz: *pbp2b*, schwarz schraffiert: *aad9*-Resistenzgen, weiß: flankierende Gene von *pbp2b*), der rote Pfeil deutet PBP2b an, wobei das aktive Serin hervorgehoben ist, grüne Pfeile markieren den deletierten Bereich von *pbp2b*, die *HincII* und *XbaI*-Schnittstellen sind angezeigt, Promotoren und Terminatoren sind durch Fahnen und Stem-Loop-Strukturen in den zu den entsprechenden Genen passenden Farben gekennzeichnet.

Zum einen wurde nicht erwähnt, ob polare Effekte auf die am 3'-Ende gelegenen Gene, wie z. B. das mit *pbp2b* ein Operon bildende *recR*, berücksichtigt wurden. In Anbetracht der Tatsache, dass die verwendete Resistenzkassette sowohl Promotor als auch Terminator besaß, war nicht auszuschließen, dass die von Kell und Mitarbeitern verfolgte Strategie zur Unterbrechung von *pbp2b* aufgrund von Effekten auf die Transkription und Translation des stromabwärts liegenden, möglicherweise essentiellen *recR* erfolglos blieb. Zum anderen stellte sich die Frage, ob der Grund für die ergebnislose Transformation nicht in der etwas zu knapp bemessenen homologen Rekombinationsfläche von 527 bp am 5'-Ende zu finden war. Experimente haben gezeigt, dass ihre Größe in einem bedeutenden Maß die Transformationseffizienz beeinflusst und dass ein Minimum von 1000 bp bei einer Insertion-Duplikation wie im vorliegende Fall gegeben sein sollte (Lee *et al.*, 1998).

Eine Literaturrecherche ergab, dass in der Vergangenheit bereits mehrere Versuche zur Inaktivierung von *pbp2b* bzw. seiner Homologen in Streptokokken sowie anderen Bakteriengattungen unternommen wurden. So war es möglich *pbp2b* in *S. gordonii* (Haenni *et al.*, 2006) und *S. thermophilus* (Stingele und Mollet, 1996; Thibessard *et al.*, 2002) zu inaktivieren; im Genom von *S. pyogenes* konnten lediglich für ein nichtfunktionelles rudimentäres PBP2b (SpyM3_1086) codierende 192 bp identifiziert werden. Das Gen für das homologe Protein in *B. subtilis* PBP2a (*pbpA*) und *Staphylococcus aureus* PBP3 (*pbpF*) war ebenfalls nicht essentiell (Murray *et al.*, 1997; Pinho *et al.*, 2000), dasjenige für das Homologe in *E. coli* PBP2 (*mrda*, vormals *pbpA*) allerdings schon (Ogura *et al.*, 1989). Eine Analyse des Homologie-Grades der Proteine, sowie der genetischen Organisation der für sie codierenden Gene erbrachte eine erstaunliche Übereinstimmung (siehe 4.5).

Angesichts der engen Verwandtschaft und konservierten genetischen Organisation stellte sich die Frage, warum für einige Streptokokken-Spezies der Verlust bzw. das Fehlen von PBP2b nicht letal war, für andere wiederum schon. Sollte die Arbeitsgruppe um Kell vielleicht die oben genannten Fehlerquellen nicht erkannt haben und *S. pneumoniae* ist doch ohne ein solches Protein lebensfähig? Zur Klärung dieser Frage wurde im Folgenden erneut versucht, das *pbp2b* dieses Bakteriums erstens zu inaktivieren und zweitens zu deletieren.

3.3.1 Inaktivierung von *pbp2b* in *Streptococcus pneumoniae* durch die Integration einer Resistenzkassette

Die Darstellung eines *pbp2b*-Inaktivierungsderivats von *S. pneumoniae* erfolgte durch die Transformation eines Konstrukts, bei dem der größte Teil von *pbp2b* durch einen Resistenzmarker ersetzt wurde, am 5'- bzw. 3'-Ende aber jeweils noch ein Rest von etwa 100 bp erhalten blieb. Hierzu wurde das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* der Janus-Kassette (siehe 2.7.3.2) (Sung *et al.*, 2001) mit Promotor aber ohne Terminator herangezogen (siehe 2.7.3.6). Die Transformation von R6 mit

dem Konstrukt und Selektion mit 200 µg/ml Kanamycin lieferte zur Überraschung $1,03 \times 10^2$ cfu/ml bei einer Lebendkeimzahl von $1,71 \times 10^8$ cfu/ml; auf der Negativkontrolle (siehe 2.6.6.2) war kein Wachstum zu verzeichnen. Dabei konnten große, eine für Pneumokokken übliche Morphologie aufweisende Kolonien und Mikrokolonien beobachtet werden. Zudem befand sich teilweise eine Art „Schleier“ über den Kolonien, sodass es den Anschein erweckte als seien diese ineinander gelaufen, obwohl sie als einzelne klar erkenntlich waren. An den darauffolgenden zwei Tagen erhöhte sich deren Anzahl sogar noch auf $2,15 \times 10^2$ cfu/ml.

Die Überprüfung der Inaktivierung von *pbp2b* in gepickten kleinen und großen Kolonien zu beiden Zeitpunkten geschah zunächst mittels PCR. Hierzu wurde unter Verwendung der drei Primerkombinationen KO_P1, KO-2b_P2, KO-Kan_P2; KO_P4, KO-2b_P3, KO-Kan_P3 und KO_P1, KO_P4 und chromosomaler DNA der Transformanten und des Wildtyps R6 als Kontrolle verschiedene Fragmente erzeugt, anhand deren Größe die korrekte Integration des transformierten Konstrukts verifiziert bzw. nicht verifiziert werden konnte. Dabei befanden sich die Primer KO_P1 und KO_P4 stromauf- und abwärts der äußersten zur Amplifikation des Konstrukts eingesetzten Primer, KO-Kan_P2 und KO-Kan_P3 innerhalb des Fragments mit dem Resistenzmarker und KO-2b_P2 und KO-2b_P3 innerhalb des durch das Fragment mit dem Resistenzmarker ersetzten Bereichs von *pbp2b*.

Während für R6 die Produkte mit den erwarteten Größen erhalten wurden, lieferten die PCR-Ansätze der ersten beiden Primer-Konstellationen für die Transformanten jeweils verschiedene Kombinationen von „positiven“ (erfolgreiche *pbp2b*-Inaktivierung) und „negativen“ (erfolglose *pbp2b*-Inaktivierung) Fragmentgrößen, wobei teilweise sogar Mischungen aus beiden auftraten. Letztere Konstellation brachte dagegen immer drei Hauptprodukte hervor, deren Größe auf eine erfolgreiche *pbp2b*-Inaktivierung (3407 bp), erfolglose *pbp2b*-Inaktivierung (4319 bp) bzw. eine Kombination aus beidem (ca. 6200 bp) schließen ließ (Abb. 3.43 A, Spur 2 bis 12). Diese waren in unterschiedlichen Mengen vertreten, was durch die Bandendicke- bzw. -stärke deutlich wurde. Fernerhin konnten je nach Beladung des Agarose-Gels zusätzlich mehrere unspezifische Banden oberhalb der drei Hauptbanden identifiziert werden. Eine präparative Aufreinigung und anschließende Sequenzierung der einzelnen Fragmente aus allen drei PCR-Ansätzen bestätigte die entsprechenden Sequenzen bzw. ermöglichte durch „Primer-Walking“ eine Aufstellung der genetischen Organisation des etwa 6200 bp großen „Hybrid“-Fragments. Eine Zusammenstellung der aus letzterem PCR-Ansatz hervorgegangenen drei Hauptprodukte befindet sich in Abb. 3.43 B.

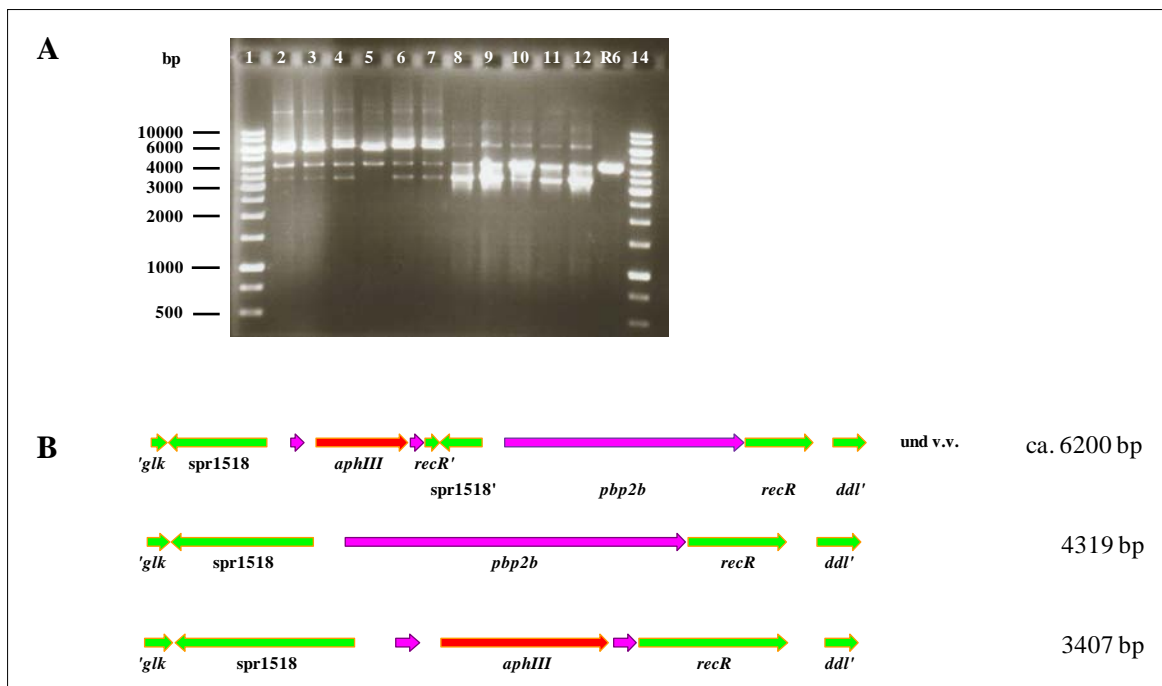


Abb. 3.43: Ergebnisse der Überprüfung der Inaktivierung von *pbp2b* in R6.

Gezeigt ist ein Agarosegel mit den aus der PCR mit der Primerkonstellation KO_P1 und KO_P4 und chromosomaler DNA mehrerer gepickter R6-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten hervorgegangenen Fragmente (A) sowie deren genetische Organisation (B). Um auch schwache Banden sichtbar zu machen, wurden 2 μ l des jeweiligen PCR-Ansatzes unverdünnt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen TAE-Agarosegel. Die Fragmentgrößen des Größenstandards sind auf der linken Seite angegeben. Spur 1, 14: Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)); Spur 2-12: R6-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten mit unterschiedlichen Rekombinationsereignissen; Spur 13: R6. Die Aufstellung der genetischen Organisation der drei Hauptprodukte wurde anhand deren Größe bzw. mittels Sequenzierung durch Primer-Walking ermöglicht. Gene sind durch Pfeile dargestellt (lila: *pbp2b*, rot: *aphIII*-Resistenzgen der Janus-Kassette, grün: flankierende Gene von *pbp2b*), wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Gene wiedergibt. Die Größe des jeweiligen Fragments ist auf der rechten Seite aufgezeigt.

Sollte PBP2b tatsächlich eine essentielle Funktion in der Zelle ausüben, so wäre mit keinen Kanamycin-resistenten Kolonien zu rechnen gewesen. Da aber dennoch verhältnismäßig viele detektiert werden konnten, waren möglicherweise noch nicht die Bedingungen für eine Inaktivierung von *pbp2b* gegeben. Im Weiteren wurde die Transformation unter veränderten Bedingungen mehrfach wiederholt. So wurde diese bei 30 °C, unter Sauerstoffausschluss, mit niedrigeren Selektionskonzentrationen (50 und 100 μ g/ml Kanamycin) und einem anderen Rezipientenstamm durchgeführt. Bei diesem Stamm handelte es sich um das *S. pneumoniae*-Derivat M31, welches über eine etwa 6 kb große das Gen für das Pneumokokken-Hauptautolysin N-Acetylmuramyl-L-alaninamidase LytA umfassende Deletion verfügte. Als Folge zeigte M31 weder eine Autolyse am Ende der stationären Phase, noch eine durch Detergentien oder β -Laktame induzierte Lyse. Für β -Laktam-resistente klinische *S. pneumoniae*-Isolate mit niederaffinem *pbp2b* wurde ein toleranter Phänotyp beschrieben, d. h., dass diese zwar in Anwesenheit des Antibiotikums ihr Wachstum einstellen, aber nicht lysieren (Grebe und Hakenbeck, 1996; Liu und Tomasz, 1985; Reichmann *et al.*, 1997). Zudem stellt PBP2b kein Target für nicht-lytische β -Laktame, wie die Cephalosporine

der dritten Generation dar. Offensichtlich ist PBP2b also mit dem Lysephänotyp in *S. pneumoniae* assoziiert und seine Inhibition Voraussetzung für die lytische Antwort (Hakenbeck *et al.*, 1987). Aufgrund dieser Tatsache konnte im vorliegenden Fall angenommen werden, dass potentielle Transformanten mit einer *pbp2b*-Inaktivierung lysiert und demnach nicht mehr greifbar waren. Durch Ausschalten des für die Lyse verantwortlichen LytA-Proteins konnte dies umgangen werden.

Bei den Wiederholungen der Transformation von R6 wurden ähnliche Resultate erzielt wie schon zu Beginn. Zusätzlich zur Überprüfung der *pbp2b*-Inaktivierung in den Transformanten durch PCR wurden nun ausgewählte aus der ersten und den folgenden Transformationen stammende Klone einer Analyse ihres PBP-Profiles mittels SDS-PAGE unterzogen. Für alle konnte die PBP2b-Bande und demzufolge die Präsenz eines funktionellen Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.44).

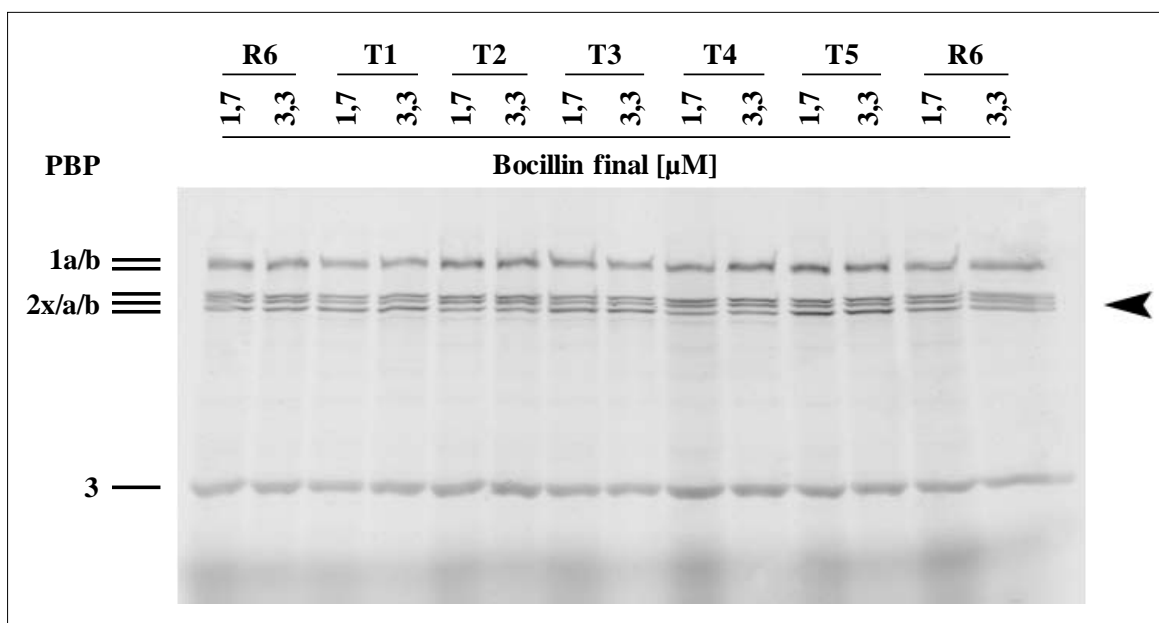


Abb. 3.44: PBP-Profil der R6-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten.

Gezeigt ist das PBP-Profil ausgewählter mit 100 und 200 µg/ml Kanamycin selektionierter R6-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten und zum Vergleich von R6. Zellysate der Transformanten und von R6 wurden für 30 min bei 37 °C mit 1,7 und 3,3 µM Bocillin™FL (final) inkubiert und die Bocillin-PBP-Komplexe nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE in einem 7,5 %igen Gel mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:1,1 mittels Fluorographie visualisiert. Die Striche auf der linken Seite markieren die Laufhöhe der jeweiligen PBP, die Pfeilspitze speziell die Lage von PBP2b. Die Gel-Beladung ist oben angegeben, wobei T1 bis T5 für die unterschiedlichen R6-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten steht.

Aus der Transformation von M31 mit dem *pbp2b*-Inaktivierungskonstrukt gingen mit bis zu $1,02 \times 10^4$ cfu/ml bei einer Lebendkeimzahl von $2,46 \times 10^8$ cfu/ml wesentlich mehr Kolonien als bei R6 hervor, was vermutlich in der um eine Zehnerpotenz höheren mitbestimmten Transformations-effizienz dieses Derivats begründet lag. Dessen ungeachtet konnte auch hier, wie die Kontroll-PCR-Ansätze demonstrierten (Abb. 3.45 A, Spur 2 bis 8, B), keine Inaktivierungsmutante isoliert werden.

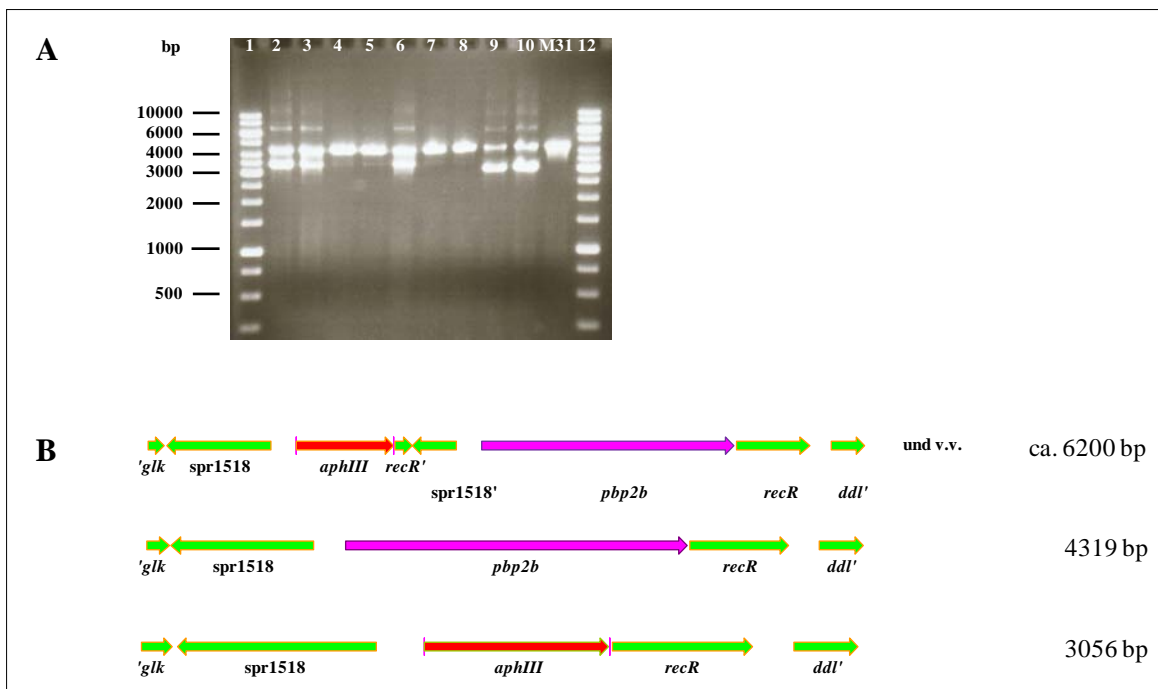


Abb. 3.45: Ergebnisse der Überprüfung der Inaktivierung und Deletion von *pbp2b* in M31.

Gezeigt ist ein Agarosegel mit den aus der PCR mit der Primerkonstellation KO_P1 und KO_P4 und chromosomaler DNA mehrerer gepickter M31-*pbp2b*-Inaktivierungs- und Deletionstransformanten (siehe 3.3.1 und 3.3.2) hervorgegangenen Fragmente (A) sowie deren genetische Organisation (B). Um auch schwache Banden sichtbar zu machen, wurden 2 μ l des jeweiligen PCR-Ansatzes unverdünnt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen TAE-Agarosegel. Die Fragmentgrößen des Größenstandards sind auf der linken Seite angegeben. Spur 1, 12: Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)); Spur 2-8: M31-*pbp2b*-Inaktivierungstransformanten mit unterschiedlichen Rekombinationsereignissen; Spur 9, 10: M31-*pbp2b*-Deletionstransformanten (siehe 3.3.2); Spur 11: M31. Die Aufstellung der genetischen Organisation der drei Hauptprodukte wurde anhand deren Größe ermöglicht, wobei die genetische Anordnung für die Inaktivierung in Abb. 3.43, für die Deletion hier gezeigt ist. Gene sind durch Pfeile dargestellt (lila: *pbp2b*, rot: *aphIII*-Resistenzgen der Janus-Kassette, grün: flankierende Gene von *pbp2b*), wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Gene wiedergibt. Die Größe des jeweiligen Fragments ist auf der rechten Seite aufgeführt.

3.3.2 In-frame-Deletion von *pbp2b* in *Streptococcus pneumoniae*

Zur Darstellung einer *pbp2b*-Deletionsmutante von *S. pneumoniae* wurde ein Konstrukt transformiert, bei welchem *pbp2b* bis auf das Start- bzw. Stopcodon komplett durch einen Resistenzmarker ersetzt war. Hierzu mußte der genaue Translationsstart dieses Gens bekannt sein, was sich als schwierig herausstellte, da in der Literatur unterschiedliche Annotationen existierten. So annotierten Hoskins *et al.*, 2001 den Beginn von *pbp2b* an der in Abb. 3.46 markierten Stelle (1. ATG), Dowson *et al.*, 1989c und Pagliero *et al.*, 2004 hingegen 12 bp weiter (2. ATG). Eine Kartierung des Transkriptionsstartpunktes von *pbp2b* mittels 5'-RACE sollte Aufschluss über den möglichen Initiationspunkt der Translation geben.

Bei der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *pbp2b* war nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des TAP-behandelten und TAP-unbehandelten Ansatzes ausschließlich bei ersterem eine Bande sichtbar, die einem PCR-Produkt von 300 bis 400 bp entsprach (siehe Abb. 3.46 und 2.7.2.6).

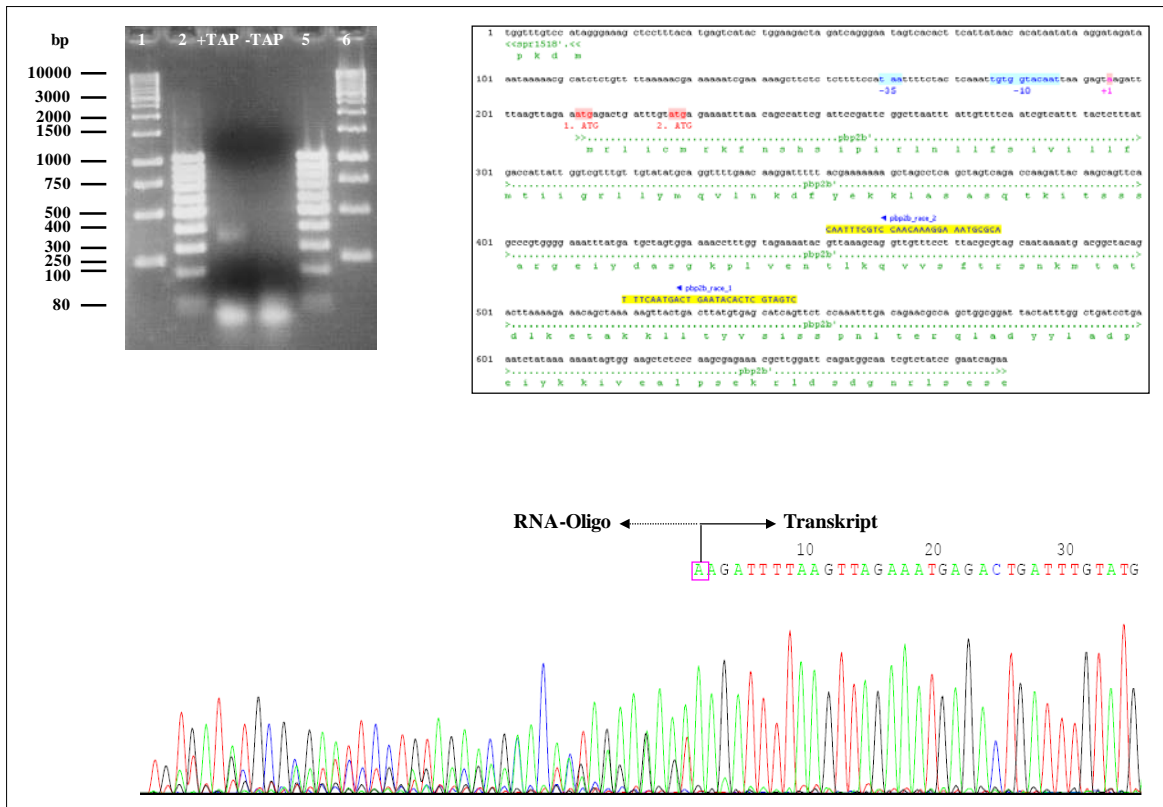


Abb. 3.46: Ergebnisse der 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *pbp2b*.

Abgebildet ist ein Agarosegel mit dem aus dem TAP-behandelten Ansatz hervorgegangen PCR-Produkt, das Chromatogramm mit der DNA-Sequenz dieses Produkts sowie ein Sequenzausschnitt mit der Promotorregion von *pbp2b*, der Lage der zur 5'-RACE verwendeten Primer und dem ermittelten Transkriptionsstartpunkt. Die Auftrennung der PCR aus dem TAP-behandelten und -unbehandelten Ansatz erfolgte in einem 2 %igen TAE-Agarosegel. Die Fragmentgrößen der Größenstandards sind auf der linken Seite angegeben. Spur 1, 5: Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)); Spur 3: PCR aus dem TAP-behandelten Ansatz; Spur 4: PCR aus dem TAP-unbehandelten Ansatz; Spur 2, 6: Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)). In dem Chromatogramm und dem Sequenzausschnitt ist der Transkriptionsstart als Fusionsstelle des RNA-Oligonukleotids mit dem *pbp2b*-Transkript rosa hervorgehoben. In dem Sequenzausschnitt ist die -35- und erweiterte -10-Region von *pbp2b* blau hinterlegt. Das von Hoskins *et al.*, 2001 (1. ATG) und Dowson *et al.*, 1989c bzw. Pagliero *et al.*, 2004 (2. ATG) annotierte Startcodon ist jeweils rot markiert. Gene sind durch grün punktierte Linien, die entsprechenden Genprodukte durch die Aminosäuresequenz und Primer durch ihre gelb hinterlegte Sequenz gekennzeichnet.

Durch die Sequenzierung dieses Produkts konnte als Transkriptionsstartpunkt die in Abb. 3.46 gekennzeichnete Base identifiziert werden. In der erhaltenen Sequenz ist die Lage des RNA-Oligonukleotids und die Fusionsstelle mit dem *pbp2b*-Transkript, welche den Start der Transkription markiert, deutlich zu erkennen. Im Bereich des Oligonukleotids trat eine Nebensequenz auf, was auf weitere Startpunkte hindeuten könnte. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit hätte das PCR-Produkt kloniert und die entsprechenden Inserts gescreent werden müssen. Der ermittelte Transkriptionsstartpunkt lag 16 bzw. 31 bp stromaufwärts des von Hoskins *et al.*, 2001 (1. ATG) bzw. Dowson *et al.*, 1989c und Pagliero *et al.*, 2004 annotierten Translationsstartpunktes (2. ATG). Demnach kamen immer noch beide ATG theoretisch als solchen in Frage. Leider war auch keine konservierte SD-Sequenz vor einem der beiden erkennbar. Am wahrscheinlichsten erschien jedoch, das dem *pbp2b*-Transkript eine üblicherweise 4 bis 14 bp große Leader-Sequenz vorausging, auf

die unmittelbar das Startcodon, also das 1. ATG, folgte. Um einen Beweis für diese Annahme zu erbringen, wären nachfolgende Experimente, wie z. B. die Herstellung von transkriptionellen Reporterfusionen notwendig gewesen. Dabei hätte sich aber aufgrund der dicht beieinanderliegenden ATG eine Messung von Unterschieden in der β -Galaktosidase-Aktivität als schwierig bzw. unmöglich erwiesen. Bei Betrachtung der Promotorregion von *pbp2b* fiel auf, dass die -35-Region stark von der Konsensussequenz (TTGACA) abwich, dagegen aber eine erweiterte und hochkonservierte -10-Region (TaTGgTATAAT) vorhanden war (Sabelnikov *et al.*, 1995). Dieses Phänomen wird bei den Promotoren zahlreicher Gene in *S. pneumoniae* beobachtet.

Unter Annahme des 1. ATG als Startcodon wurde nun im Folgenden eine In-frame-Deletion von *pbp2b* vorgenommen. Dazu wurde das Kanamycin-Resistenzgen *aphIII* der Janus-Kassette (siehe 2.7.3.2) (Sung *et al.*, 2001) ohne Promotor, SD-Sequenz und Terminator so in das Genom integriert, dass von *pbp2b* nur noch das Start- bzw. Stopcodon vorhanden war und *aphIII* unter der Kontrolle des *pbp2b*-Promotors stand (siehe 2.7.3.7). Hierbei bestand jedoch die Gefahr, dass letzterer zu schwach war und folglich keine resistenten Transformanten auftraten.

Bei der Transformation von R6 mit dem Deletionskonstrukt erschienen trotz Austesten mehrerer Selektionskonzentrationen (50, 100 und 200 μ g/ml Kanamycin) auch nach mehreren Tagen Inkubation keine resistenten Kolonien auf den Platten. Die Transformation von M31 brachte immerhin bis zu 150 cfu/ml bei einer Lebendkeimzahl von 7×10^7 cfu/ml hervor; die Negativkontrolle (siehe 2.6.6.2) blieb unbewachsen. Diese Anzahl lag weit unter der, welche für die Transformation des *pbp2b*-Inaktivierungskonstrukts dokumentiert wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei letzterer zwei Promotoren zusammenwirkten, nämlich der von *pbp2b* und der Janus-Kassette, hier aber nur ersterer präsent war. Bei der Überprüfung der *pbp2b*-Deletion in gepickten M31-Kolonien mittels PCR (siehe 3.3.1) kamen auch hier die bereits in 3.3.1 aufgeführten Befunde zum Vorschein (siehe Abb. 3.45 A, Spur 9 und 10, B). Dabei warf das erneute Erscheinen der drei Banden mit letzterer Primerkonstellation die Frage auf, ob es sich bei den gepickten Transformanten um Mischpopulationen handelte und eine Vereinzelung anhand der Kolonienmorphologie möglich sei. Um dies zu überprüfen, wurde von der Glycerinkultur einer der Transformanten ein Ausstrich auf eine Platte mit 200 μ g/ml Kanamycin angefertigt. Nach zwei Tagen Inkubation wurden wie schon bei den eigentlichen Transformationen unterschiedlich große Kolonien vorgefunden; am vierten Tag waren hingegen keine Unterschiede in der Größe mehr festzustellen. Für die PCR-Analyse von zu ersterem Zeitpunkt gepickten kleinen und großen Kolonien bot sich das gleiche Bild wie für die Ausgangstransformante.

Die mikroskopische Untersuchung von aus allen Transformationen stammenden analysierten Klonen ergab für die R6-Klone keine Abweichungen von der typischen Diplokokken- und kurzen Ketten-Morphologie des Wildtyps. Dagegen zeichnete sich bei den M31-Klonen, deren Ausgangsstamm M31 natürlicherweise zur Kettenbildung neigt, eine starke Verklumpung und Konglomeratbildung der Ketten sowie morphologische Aberrationen der einzelnen Zellen ab (nicht gezeigt).

4 Diskussion

PBP2x spielt als essentielles Enzym und wichtigste primäre Resistenzdeterminante eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae*. Auch wenn dieses Protein im Hinblick auf die Evolution von Mosaikgenen zu den am besten charakterisierten PBP zählt, ist bisher nur sehr wenig über die physiologischen Konsequenzen seiner Modifizierung und das Resistenzpotential einzelner Punktmutationen bekannt. Zum Verständnis der Bedeutung von PBP2x-Mutationen für die Resistenz und Zellphysiologie wurden in dieser Arbeit zwei methodische Ansätze gewählt. Zum einen erfolgte eine Mutationsanalyse der immer wieder in resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten mutierten Position Thr338 im aktiven Zentrum von PBP2x und anschließende Charakterisierung der Phänotypen im Kontext mit der sekundären Resistenzdeterminante PBP1a und den Zwei-Komponenten-Systemen CiaRH und ComDE, zum anderen wurde eine globale Transkriptomstudie spontanresistenter Mutanten mit Punktmutationen in PBP2x und der HK CiaH durchgeführt. Unabhängig davon wurde eine im Rahmen von Literaturrecherchen aufgetretene Publikation über die erfolgreiche Inaktivierung des *pbp2b* von *S. gordonii*, einer mit *S. pneumoniae* eng verwandten Streptokokken-Art, zum Anlass genommen, einen früheren erfolglos gebliebenen Versuch zur Unterbrechung des Pneumokokken-*pbp2b* zu überprüfen und unter Anwendung zweier anderer Strategien zu wiederholen.

In den ersten drei Teilen der Diskussion werden die Ergebnisse der Mutations- und Transkriptomanalyse unter funktionellen Aspekten zusammengeführt und erörtert. Davon ausgehend wird ein mögliches Modell für das Zusammenspiel von PBP2x, CiaRH und ComDE vorgestellt. Der fünfte Teil beschäftigt sich mit der Darstellung einer *pbp2b*-Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante von *S. pneumoniae*. Ein kurzer Ausblick soll die Richtung einer Weiterführung der hier dargestellten Experimente aufzeigen.

4.1 PBP2x-Mutationen und die β -Laktam-Resistenz

Die Mosaik-PBP2x von resistenten klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten können mehr als 100 Punktmutationen mit durchschnittlich 40 Aminosäuresubstitutionen allein in der Penicillin-Binde-Domäne enthalten (Asahi *et al.*, 1999; Hakenbeck *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1997). Darüber hinaus existieren sehr viele Varianten dieser *pbp2x*-Mosaikgene und kompensatorische bzw. kooperative Wechselwirkungen zwischen den Mutationen. Dieser Polymorphismus erschwert die Unterscheidung zwischen Austausch mit Resistenzrelevanz und solchen, die für die Resistenz irrelevant und auf den Ursprung des Gens zurückzuführen sind bzw. der Aufrechterhaltung der *in vivo*-Funktion des Proteins dienen. Um den Einfluss einer einzelnen Substitution auf die Resistenz aufzudecken, ist es deswegen unumgänglich, Punktmutanten herzustellen und zu charakterisieren.

Die Präsenz einer Mutation an Position Thr338 in unmittelbarer Nachbarschaft des aktiven Serins in fast jedem niederaffinen PBP2x von resistenten klinischen Pneumokokken- und kommensalen

Streptokokken-Stämmen, macht diese Position zu einem interessanten Kandidaten für derartige Untersuchungen. In der Mehrheit der Fälle ist hier ein T338A-Austausch anzutreffen, weniger häufig eine T338P- oder T338S- und insbesondere im Zusammenhang mit hoher Cefotaxim-Resistenz eine T338G-Mutation (Asahi *et al.*, 1999; Bergmann, 2003; Bicmen *et al.*, 2006; Carapito *et al.*, 2006a; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; du Plessis *et al.*, 2002; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002; Sanbongi *et al.*, 2004; Schmitt, 2004; Smith und Klugman, 2005). Enzymkinetische Studien mit löslichen PBP2_{xT338}-Derivaten, sowie Rückmutation dieser Position in *pbp2x*-Mosaikgenen deuteten auf die Beteiligung einer solchen Mutation an der β -Laktam-Resistenz hin (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Smith und Klugman, 2005). Aufgrund der erfolglosen Selektion einer Thr338-Punktmutation blieb jedoch ihr alleiniger *in vivo*-Effekt auf die Resistenz ungeklärt (Carapito *et al.*, 2006a; Chesnel *et al.*, 2003). Diese früheren Selektionsversuche scheiterten möglicherweise daran, dass das standardmäßig zur Selektion von PBP2_x-Mutationen eingesetzte Cephalosporin Cefotaxim verwendet und kein weiteres β -Laktam getestet wurde. Dabei wurde aber außer Acht gelassen, dass PBP2_x auch das primäre Target für Penicilline darstellt (Dowson *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1993). Basierend auf früheren Beobachtungen in der Arbeitsgruppe, dass sich Thr338-Austausche tatsächlich eher mit dem Penicillin-Derivat Oxacillin selektionieren lassen als mit Cefotaxim, erfolgte in dieser Arbeit ihre Selektion mit ersterem. Für die Einführung einer T338A-, T338P- und T338G-Punktmutation in den β -Laktam-sensitiven Wildtyp R6 wurden Codons ausgewählt, welche am häufigsten in resistenten Streptokokken auftraten, um einen möglichst engen Bezug zur Realität herzustellen. Die MHK-Bestimmung der konstruierten Thr338-Mutanten ließ abhängig von der jeweiligen Aminosäuresubstitution und dem β -Laktam einen 2 bis 3fachen Resistenzanstieg erkennen, wobei der höchste mit T338G und Oxacillin, der geringste mit Penicillin G und T338A erzielt wurde. Die Unterschiede in den Resistenzen wurden durch die Visualisierung der β -Laktam-Affinitäten der PBP2_{xT338}-Derivate mittels Bocillin-Markierung und anschließender SDS-PAGE bestätigt. Alle Befunde deckten sich zudem mit den ermittelten Acylierungseffizienzen aus früheren Kinetikstudien (Carapito *et al.*, 2006a; Carapito *et al.*, 2006b; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998). Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass eine Punktmutation an Position Thr338 einen selektionierbaren Resistenzphänotyp vermittelt. Ein einzelner Austausch in PBP2_x führt üblicherweise zu einer 2 bis 4fache Zunahme der Cefotaxim-Resistenz; die bislang stärkste Erhöhung mit einem Faktor 15 wurde für T550A- bzw. T550G-Mutationen beschrieben (Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 2008; Sifaoui *et al.*, 1996). Die Cefotaxim-MHK war im vorliegenden Fall mit einem Faktor 2 allerdings kaum erhöht, was daran liegen mag, dass mit Oxacillin selektioniert wurde; und die MHK von dem Selektionsantibiotikum abhängig ist. Der Anstieg der Piperacillin-Resistenz mit der T338P-Substitution fiel im Hinblick auf die übrigen β -Laktame erstaunlich gering aus, wofür die

aus der ungewöhnlich „sperrigen“ Struktur dieses Antibiotikums in Verbindung mit der veränderten Aminosäure Prolin resultierenden Bindungseffekte verantwortlich sein könnten. Hierbei kommt ein Nachteil der Robot-Technologien wie der Alanin-Scanning-Mutagenese zum Vorschein, bei der das Protein ausschließlich mit der Aminosäure Alanin mutagenisiert und eine Detektion der von verschiedenen Aminosäureresten ausgehenden Auswirkungen auf die Resistenz somit unmöglich wird (Carapito *et al.*, 2006b). Die unterschiedlichen Effekte der drei Thr338-Punktmutationen auf die β -Laktam-Resistenz sind auf die Struktur des jeweiligen Aminosäurerestes zurückzuführen. Mit jeder der drei Mutationen geht der Verlust einer Hydroxylgruppe einher, welche in die Bindung eines für die Enzym-Stabilität und Wechselwirkung mit β -Laktamen wichtigen Wassermoleküls innerhalb eines lokalen Netzwerks von Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum involviert ist. Es wird angenommen, dass hierdurch eine modifizierte katalytische Aktivität des Proteins begünstigt wird, was sich in einer reduzierten Affinität gegenüber β -Laktamen äußert (Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1998). Während die Einführung der beiden Helixbrecher Prolin und Glycin extreme sterische und elektrostatische Folgen mit sich bringt, wird mit der kleinen hydrophoben Aminosäure Alanin lediglich eine schwache Hydrophobizität induziert. Demnach ist mit ersteren beiden auch eine größere Wirkung auf die Resistenz zu erwarten als mit letzterem.

Eine Thr \rightarrow Ala-Mutation in den konservierten Motiven von PBP ist eine verbreitete und effektive Methode zur Reduktion der β -Laktam-Affinität. So ist in den Mosaik-PBP1a von resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten eine zur T338A- homologe T371A(S)-Substitution neben dem aktiven Serin in der STMK-Box zu finden und für niederaffine PBP2b bzw. PBP2x wurde ein T446A- bzw. T550A-Austausch hinter der KTG- bzw. KSG-Box dokumentiert (Asahi *et al.*, 1999; Asahi und Ubukata, 1998; Coffey *et al.*, 1995; Contreras-Martel *et al.*, 2006; Dowson *et al.*, 1993; Grebe und Hakenbeck, 1996; Job *et al.*, 2008; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991; McDougal *et al.*, 1995; Mouz *et al.*, 1999; Pagliero *et al.*, 2004; Sifaoui *et al.*, 1996; Smith und Klugman, 1998, 2003).

Der Vergleich des Resistenzpotentials einer Thr338-Punktmutation mit dem des Mosaik-PBP2x aus dem hoch-Penicillin- und multiresistenten klinischen Pneumokokkenstamm 2349, welches die T338A-Mutation aufweist, ergab bezüglich der MHK für Benzylpenicillin und Piperacillin fast keine Differenzen. Für Cefotaxim und Oxacillin wurden mit dem klinischen PBP2x hingegen wesentlich höhere Resistenzen erreicht. Offenbar haben die übrigen Substitutionen in dem Mosaikblock keine weitere bzw. eine inhibierende Wirkung auf die Resistenz gegenüber Penicillin und Piperacillin. Der stärkste Resistenzanstieg ist auch bei dem Mosaik-PBP2x mit dem Penicillin-Derivat Oxacillin zu verzeichnen. Bei Oxacillin handelt es sich um ein für die Behandlung von Pneumokokken-Infektionen sehr ineffektives β -Laktam, mit dem kaum Kreuzresistenzen zu beobachten sind und was schon lange in klinischem Gebrauch ist. Beides macht sich in deutlich höheren MHK-Werten bemerkbar, welche aber gleichzeitig eine bessere Differenzierung zwischen

Sensitivität und Resistenz erlauben und somit die Identifizierung von resistenten Stämmen erleichtern.

PBP2x-Mutationen können mit einem ganzen Spektrum von verschiedenen Resistenzphänotypen assoziiert sein, von denen einige auch im Rahmen der hier durchgeführten Charakterisierungen von Mutanten zum Vorschein kamen. Der auf der sechsten Stufe der C006-Familie spontan Cefotaxim-resistenter Labormutanten auftretende G422D-Austausch vermittelt keine weitere Resistenz, sondern eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C Inkubation (diese Arbeit) (Krauß *et al.*, 1996). Ein ähnliches Phänomen in abgeschwächter Form konnte für die L600W- bzw. T550A-Mutation in der C001-Familie für Cefotaxim und Oxacillin bei 30 °C ausgemacht werden. Für die Temperatursensitivität von C606 ist vermutlich die in dieser Mutante aufgefallene verminderte PBP2x-Menge ausschlaggebend, welche auf die durch das Zwei-Komponenten-System CiaRH regulierte Serin-Protease HtrA zurückgeführt werden konnte (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009). Diese Proteasen sind für den Abbau mißgefalteter Proteine – aufgrund hoher Temperaturen oder anderer Stressfaktoren – verantwortlich. Die Aminosäuresubstitution G422D beeinträchtigt scheinbar die Faltung bzw. Stabilität von PBP2x bei 37 °C, was daraufhin von HtrA abgebaut wird. Die Menge eines PBP in der Zelle kann entscheidend zur Höhe der β -Laktam-Resistenz beitragen: Ist mehr mutiertes Protein vorhanden, so ist auch mehr β -Laktam erforderlich, um eine Inhibition zu erzielen, was sich in einer höheren MHK manifestiert (Fontana *et al.*, 1983; Giles und Reynolds, 1979; Hakenbeck *et al.*, 1980). Die Microarray-Daten für den Vergleich von C606 bei 37 und 30 °C Inkubation, bei denen eine 4fach erhöhte Expression des *htrA*-Gens bei 37 °C festgestellt werden konnte, sprechen für diese Hypothese. Die bereits durchgeführten Western-Blotting-Analysen lieferten keine Divergenzen zwischen der PBP2x-Menge in C606 bei 37 und 30 °C (Maurer, persönliche Mitteilung). In Anbetracht der Tatsache, dass aber offensichtlich unterschiedliche Varianten dieses Stammes in der Arbeitsgruppe kursieren, darunter solche, welche wahrscheinlich aufgrund von kompensatorischen Veränderungen eine gleiche MHK bei 37 und 30 °C an den Tag legen, dürfte sich eine Detektion von Unterschieden wohl als sehr schwierig gestalten. Ein leichter Abbau von PBP2x durch HtrA könnte bereits im Wildtyp stattfinden, da die Hypersensitivität durch Transformation des PBP2x_{C606} in diesen genetischen Hintergrund zum Teil übertragen wurde (diese Arbeit) (Koch, 2006). Es ist durchaus denkbar, dass auch die MHK-Temperatursensitivität der C001-Mutanten auf einem solchen Effekt basiert. Hier scheinen allerdings eine bzw. beide PBP2x-Mutationen eine fehlerhafte Faltung, und damit vermehrte Degradation des Proteins bei 30 und nicht bei 37 °C hervorzurufen. Ebenso könnten temperaturmodulierte Penicillin- bzw. β -Laktam-Binde-Aktivitäten der mutierten PBP2x zu der Sensitivität beitragen. Letztendlich spielen noch weitere PBP2x-unabhängige Faktoren eine Rolle, wie z. B. eine unzureichende Anpassung dieser bei 30 °C selektierten Labormutanten an eine Temperatur von 37 °C (siehe 4.2.1.3), da auch in der Mutante C202, welche über keine PBP2x-, sondern zwei

CiaH-Austausche verfügt, leichte Temperatur-bedingte Abweichungen in der MHK sichtbar wurden.

4.2 PBP2x-Mutationen und die Zellphysiologie

Auf den ersten Blick scheinen Pneumokokken mit niederaffinen PBP keine Nachteile von der erworbenen Resistenz davonzutragen. Die meisten resistenten klinischen Isolate und Labormutanten zeigen eine Wachstumsrate und Zellmorphologie vergleichbar mit der von sensitiven Stämmen. Und auch die in einigen Fällen beobachteten biochemischen Veränderungen in der Peptidoglykan-Zusammensetzung treten unabhängig von PBP-Modifikationen auf (Chi, 2004; Jabes *et al.*, 1989; Laible *et al.*, 1991; Severin *et al.*, 1996). Im Gegenteil, die erfolgreiche Ausbreitung von Klonen mit multiplen PBP-Mosaikgenen, wie dem hoch-Penicillin- und multiresistenten 23F-Serotyp (Reichmann *et al.*, 1997) demonstriert, dass diese Gene offenbar sogar Vorteile für ihren Träger haben, sodass ihre Eliminierung nicht notwendig ist und sie sich relativ stabil in Populationen halten können. Interessanterweise ist der Besitz eines niederaffinen PBP2b mit einem doppelten Nutzen verbunden: β -Laktam-Resistenz und einem toleranten Phänotyp, wobei letzteres maßgeblich zur Persistenz und Verbreitung und damit zum Erfolg der betreffenden Stämme beiträgt (Grebe und Hakenbeck, 1996; Hakenbeck *et al.*, 1987; Liu und Tomasz, 1985; Reichmann *et al.*, 1997). Tatsächlich machen sich jedoch bei genauerem Hinsehen „Fitness“-Einbußen durch die PBP-vermittelte Resistenz bemerkbar. In dieser Arbeit konnte die Tragweite des Erwerbs von β -Laktam-Resistenz am Beispiel der primären Resistenzdeterminante PBP2x aufgezeigt werden, worauf im Folgenden nun näher eingegangen wird.

4.2.1 PBP2x-Mutationen: Auswirkungen auf die Zelle

4.2.1.1 Wachstum, Morphologie und Vitalität

Im Vergleich mit dem Wildtyp ließen alle charakterisierten PBP2x-Mutanten eine höhere Generationszeit, niedrigere maximale Zelldichte und zum Teil verkürzte stationäre Phase erkennen. Dabei variierte das Ausmaß der Wachstumsdefizite abhängig von der Art der PBP2x-Mutation. Derivate mit Punktmutationen (R6_{pbp2xT338}-Mutanten, R6_{pbp2xC303}, C301, C106, C206) wiesen generell die stärksten Defekte auf, während die Präsenz eines klinischen Mosaik-PBP2x nahezu keine Einschränkungen im Wachstum mit sich brachte (R6_{pbp2x2349}). Bei den Punktmutationen gab es nochmal Unterschiede, was den Schweregrad betraf, wobei offenbar eine Korrelation zwischen dem Resistenzpotential einer Aminosäuresubstitution und letzterem bestand. Es galt: je größer der Effekt einer Substitution auf die β -Laktam-Resistenz, desto größer die Auswirkungen auf das Wachstum. Demnach waren diese bei R6_{pbp2xT338G}, R6_{pbp2xC303} und C301 mit einem hohen

Resistenzniveau ausgeprägter als bei den weniger resistenten Stämmen R6_{pbp2xT338A}, R6_{pbp2xT338P}, C106 und C206. Auch die in den Thr338-Punktmutanten in Mitleidenschaft gezogene Zellmorphologie und -vitalität deutete auf einen „Fitness“-Verlust hin.

4.2.1.2 Zellwand-Zusammensetzung

Wie die Resultate der Zellwand-Analyse im genetischen Hintergrund der C003-Familie offenbarten, wirkten sich PBP2x-Mutationen auch auf die Zusammensetzung des Peptidoglykans aus. Im Murein wurde ein erhöhter Anteil an Monomeren, reduzierter an linearen Dimeren und Trimeren, aber fast gleichbleibender an verzweigten Dimeren vorgefunden, wobei diese Modifikationen ausschließlich in den Mutanten mit PBP2x_{C303} auftraten und somit eindeutig von dem mutierten PBP2x herrührten. Die Zunahme der Penta- und Tripeptid-Monomere in Verbindung mit der Abnahme der linearen Tetra-Tripeptid-Dimere und Trimere läßt auf eine unzureichende Transpeptidierung und damit enzymatische Beeinträchtigung des PBP2x_{C303} schließen. Die Quervernetzung findet normalerweise zwischen einem Pentapeptid, welches als „Donor“ und natürliches Substrat von PBP2x fungiert, und einem „Akzeptor“, wie einem Tri-, Tetra- oder weiteren Pentapeptid statt. Das fünfte D-Alanin des Pentapeptid-Donors wird dabei abgespalten, wodurch die für diese Reaktion benötigte Energie geliefert wird (Goffin und Ghuysen, 2002; Severin und Tomasz, 2000; Vollmer, 2007b). Kann die Reaktion nun aufgrund einer gestörten enzymatischen Aktivität von PBP2x nicht mehr effektiv ablaufen, kommt es zu der im vorliegenden Fall signifikanten Anhäufung von Donor- und Akzeptormolekülen bei einer gleichzeitigen Reduktion der Produkte, der quervernetzten Dimere und Trimere.

Obendrein fiel ein charakteristischer Rückgang der Tetrapeptide auf, welche normalerweise bei der durch PBP3 katalysierten D,D-Carboxypeptidierung entstehen, d. h. der Spaltung der terminalen D-Alanin-D-Alanyl-Bindung in den Pentapeptiden. Während diese als Donor- und Akzeptormoleküle bei der Transpeptidierung dienen, können Tetrapeptide lediglich als Akzeptoren genutzt werden. Durch die Limitierung der Pentapeptid-Einheiten wird also der Grad der Quervernetzung reguliert (Hakenbeck und Kohiyama, 1982; Morlot *et al.*, 2004; Severin *et al.*, 1992). Denkbar wäre, dass die katalytische Aktivität von PBP3 in den Stämmen mit verändertem PBP2x durch einen Interaktions- oder Regulationsmechanismus herabgesetzt ist, um genügend Pentapeptide mit „Doppelfunktion“ für andere PBP zur Verfügung zu stellen, welche dann das Transpeptidierungs-Defizit kompensieren können. In diesem Zusammenhang war der Befund von Interesse, dass die Menge an verzweigten Dimeren im Peptidoglykan nahezu konstant blieb. Sollte ein anderes PBP, welches auf die Quervernetzung verzweigter Pentapeptide spezialisiert ist und Tetrapeptide als Akzeptormoleküle bevorzugt, die Funktion von PBP2x übernommen haben? In Frage käme dafür zum Beispiel PBP1a, das bei der Zellteilung mit PBP2x an der äquatorialen Wachstumszone kolokalisiert (Morlot *et al.*, 2003) und wahrscheinlich mit diesem interagiert (siehe 4.3). Folglich läge die Dezimierung der Tetrapeptide nicht in einem weniger aktiven PBP3, sondern in einem

gesteigerten Verbrauch dieser Peptide begründet. Ein kooperatives Wirken zweier PBP, bei dem eine suboptimale Funktion eines PBP die Funktion eines anderen beeinflusst, wurde für PBP2 und PBP4 von *Staphylococcus aureus* bei der Zellwand-Synthese und Antibiotika-Resistenz beschrieben (Łęski und Tomasz, 2005).

Die oben geschilderten Aberrationen betrafen nur das Muropeptidprofil des Mureins der PBP_{2xC303}-Derivate, dasjenige der Zellwand (Murein und WTAs) blieb davon unberührt. Vor dem Hintergrund, dass aber auch im Muropeptidprofil der Zellwand nur Muropeptide ohne WTAs sichtbar sind (siehe 3.1.4.3), könnte angenommen werden, dass der im Murein-Profil zusätzlich vorhandene ehemals WTA-haltige Anteil an Muropeptiden für diese Modifikationen verantwortlich ist. Dementsprechend wären überwiegend Muropeptide ohne WTAs quervernetzt, Muropeptide mit WTAs hingegen fielen aufgrund fehlender Quervernetzung und Stabilität dem Abbau durch zell-eigene Hydrolasen zum Opfer. Ein solches Szenario würde auf zusätzliche Störungen in der koordinierten Inkorporation von Peptidoglykan- und TA-Einheiten in der äquatorialen Zellwand-Wachstumszone deuten. Untersuchungen haben gezeigt, dass Peptidoglykan- und TA-Einheiten in dieser Zone synchron synthetisiert und miteinander verknüpft werden, wobei die WTAs normalerweise nur an quervernetztes Peptidoglykan gebunden werden (Fischer und Tomasz, 1984, 1985; Tomasz *et al.*, 1975). Indirekt könnte hiervon auch der LTA-Anteil betroffen sein, da dieser möglicherweise über einen Regulationsmechanismus von der WTA-Menge abhängt (Volz, 2008). Die hieraus resultierende Verschiebung der TA-haltigen Muropeptid-Fraktion und des WTA/LTA-Gleichgewichts in der Zellwand hätte weitreichende Konsequenzen für die Zellphysiologie. Prozesse wie Autolyse, Kompetenz und β -Laktam-Toleranz, bei denen in PBP2x-Mutanten in der Tat Veränderungen beobachtet werden, basieren auf einem intakten Verhältnis von TA-haltigen zu nicht TA-haltigen Muropeptiden und WTAs zu LTAs in der Zellwand.

Auch wenn die Defekte des Murein-Muropeptidprofils dem Zellwand-Profil fehlten, gab es trotz allem eine einzige Auffälligkeit, die bereits bei ersterem sichtbar war: der markante Abfall der Tetrapeptide in den PBP2x_{C303}-Stämmen. Das bestärkt die Annahme eines generellen Regulationsmechanismus, welcher in Verbindung mit PBP2x-Substitutionen auftritt.

Letzten Endes wurde bei der Analyse der Zellwand-Zusammensetzung nur das Profil des Mureins erfasst, da der Muramidase-Verdau vermutlich in Anwesenheit von TAs nicht quantitativ ist und die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand-Präparation somit auch keine quantitative Aussage erlaubt (Vollmer, persönliche Mitteilung). Die Schlussfolgerungen aus dem Muropeptidprofil der Zellwand sind momentan also rein spekulativ. Eine mengenmäßige Bestimmung der TAs in der Zellwand der Mutanten würde mehr Aufschluss geben, benötigt aber komplizierte Analysen, die biophysikalische Methoden miteinbeziehen.

4.2.1.3 Metabolismus

Die Microarray-basierte globale Transkriptomanalyse ausgewählter PBP2x-Mutanten brachte noch weitere Auswirkungen der PBP2x-vermittelten β -Laktam-Resistenz zum Vorschein. Betroffen war beinahe die gesamte Bandbreite an zellulären Prozessen in *S. pneumoniae*: Kompetenz (siehe 4.2.3), Virulenz, Bakteriocinproduktion und -immunität, Stoffwechsel- und Transportvorgänge. Dabei waren die markantesten Transkriptionsveränderungen abgesehen vom Kompetenz-Regulon bei Genen des Metabolismus, insbesondere des Stickstoffmetabolismus zu verzeichnen. Unter diesen Genen, welche für Proteine des Purin-, Pyrimidin- (Nukleotid-, Nukleosid-), Cofaktor-, Vitamin- und Aminosäurestoffwechsels codierten, war die erste Gruppe die wohl auffälligste. In allen untersuchten Mutanten ausgenommen C301, C401 und C402 hochreguliert, schienen die Purin-Gene eine wichtige Rolle im Kontext mit bestimmten PBP2x-Mutationen zu spielen. Auch der in der C006-Familie beobachtete kontinuierliche Anstieg der Transkription dieser Gene, die am stärksten reguliert waren, ließ vermuten, dass sie mehr als eine metabolische Funktion wahrnehmen könnten.

Zu den Purinen zählen Adenin und Guanin, welche zusammen mit den Pyrimidinen Thymin, Cytosin und Uracil die zwei chemischen Klassen der Stickstoffbasen in Nukleotiden bilden. Nukleotide erfüllen neben ihrer Hauptfunktion als Bestandteile der Nukleinsäuren noch andere Aufgaben in der Zelle. Sie fungieren als Energieträger, sei es als universelle Energiewährung ATP oder als aktivierte Form vieler Verbindungen bei Biosynthesen. Zudem sind sie als Signalmoleküle und Bausteine von Coenzymen für die Kontrolle von Stoffwechselabläufen unentbehrlich. Die bei der *de novo*-Synthese von Purinen für die Bildung von Inosinmonophosphat (IMP), der Vorstufe von ATP und GTP, aus 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) erforderlichen Gene sind im Pneumokokken-Genom in einem einzigen Cluster organisiert, flankiert von *comB* und *strH*. Microarray- und Northern-Blot-Analysen ergaben, dass die ersten sieben (*purCLFMN-vanZ-purH*) und die letzten vier Gene (*purEK-spr0055-purB*) dieses Clusters als Einheit, das Gen *purD* separat transkribiert werden (Ng *et al.*, 2003). Ein weiteres Pur-Gen, *purA* (spr0021), für das Enzym, welches die Formation von Adenosinmonophosphat (AMP) aus IMP katalysiert, befindet sich weiter stromaufwärts. Darüber hinaus konnte mit *purR* (spr1793) das Gen für das Homolog des Purin-Biosynthese-Regulators PurR aus *B. subtilis* und *Lactococcus lactis* im Genom von *S. pneumoniae* identifiziert werden (Ng *et al.*, 2003). Die Regulation der Purin-Biosynthese ist in den ersten beiden Organismen im Gegensatz zu *S. pneumoniae* gut erforscht; die genetische Organisation der *pur*-Gene unterscheidet sich jedoch in allen drei Bakterienarten (Ebbole und Zalkin, 1987; Nilsson und Kilstrop, 1998; Peltonen und Mantsala, 1999; Switzer *et al.*, 2002). In *B. subtilis* werden diese Gene durch zwei Mechanismen reguliert: zum einen über eine PRPP-signalisierte Repression ihrer Transkription durch PurR, als Antwort auf eine erhöhte intrazelluläre Adenin- bzw. Adenosin-Konzentration (Weng *et al.*, 1995; Weng und Zalkin, 2000; Xuan *et al.*, 2005), zum anderen über eine Attenuation, bei der Guanin bzw. Guanosin eine PurR-unabhängige

vorzeitige Termination der Transkription bewirkt (Ebbole und Zalkin, 1987, 1988, 1989). Das PurR-Homolog des mit *S. pneumoniae* metabolisch verwandten *L. lactis* scheint hingegen als Aktivator der Genexpression zu wirken (Kilstrup und Martinussen, 1998). Allem Anschein nach dient PurR in Pneumokokken als Repressor für die Transkription des *pur*-Clusters; weitere Kontrollmechanismen transkriptioneller oder translationeller Natur sind jedoch nicht auszuschließen (Ng *et al.*, 2003). Für die Existenz von letzteren spricht die Beobachtung, dass bei keinem der analysierten Transkriptomprofile, selbst dort, wo sich eine verringerte Transkriptmenge der *pur*-Gene manifestierte, nämlich in C301, C401, C202 und C402, *purR* differentiell exprimiert wurde. Das Transkriptionsmuster der Gene für den Transport und das Recycling (Salvage) von Purinen korrelierte mit dem der Synthese-Gene. Ebenso konnte eine Übereinstimmung bei der Expression der Gene des Pyrimidin-Metabolismus festgestellt werden; allerdings verhielten diese sich eher unauffällig. Gene des Purin-, Pyrimidin- aber auch generell Stickstoffstoffwechsels waren bereits in vorangegangenen Transkriptomstudien von *S. pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*, besonders unter der Exposition von Antibiotika wie Vancomycin, Penicillin und Translations-Inhibitoren aufgefallen (Fox *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 2005; Heintz, 2006; Hübscher *et al.*, 2007; Mongodin *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2007; Sasková *et al.*, 2007; Volz, 2008). Bei einer dieser Analysen zeigte sich eine Kopplung der Transkription von *pur*-Genen und Genen für Proteine des Folatmetabolismus (Ng *et al.*, 2003), ein solcher Zusammenhang konnte speziell in den C006-Mutanten ausgemacht werden.

Warum aber nimmt der Stickstoffstoffwechsel eine so bedeutende Stellung bei der β -Laktam-Resistenz von Labormutanten ein? Mit Penicillin-Resistenz ist indirekt oder direkt eine ganzheitliche Umstrukturierung der Zellhülle verbunden. Diese erstreckt sich vor allem auf die Zellwand (siehe 4.2.1.2), aber auch auf die Membran-Zusammensetzung, wie die Signifikanz von Genen des Glycero(phospho)lipidmetabolismus und einer ganzen Reihe ABC-Transportern bei den Microarray-Analysen demonstrieren (siehe unten). Es liegt auf der Hand, dass die zur Kompensierung der Folgen von PBP-Mutationen eingeleiteten Maßnahmen mit einem hohen Energieverbrauch einhergehen. Die bakterielle Zellwandsynthese und Zellteilung erfordert sehr viel Energie, welche als Uridintriphosphat (UTP) in den aktivierten Vorstufen oder ATP zur Verfügung gestellt werden muß. Eine ungenügende Quervernetzung infolge der beeinträchtigten Transpeptidase-Aktivität eines mutierten PBP2x (siehe 4.2.1.2) könnte durch eine gesteigerte Zellwandsynthese ausgeglichen werden. Im vorliegenden Fall war jedoch die Transkription der Purin-Gene kennzeichnend, sodass davon ausgegangen werden kann, dass vorrangig das Purin-enthaltende ATP und nicht das Pyrimidin-enthaltende UTP konsumiert wurde. Auch die für den Abbau mißgefalteter und mutierter Proteine und die Bildung von Multienzymkomplexen verantwortlichen Proteasen und Chaperone erfordern ATP (siehe 4.1). Gerade letzteres dürfte erschwert sein, wenn beteiligte Proteine wie PBP Mutationen aufweisen, welche eine Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen. Überdies schließen metabolische Anpassungen eine veränderte Expression von ABC-

Transportproteinen ein, welche ebenfalls auf eine ausreichende Energieversorgung angewiesen sind (siehe unten). Schließlich führen Veränderungen in der Membran-Komposition, -Integrität und im WTA/LTA-Verhältnis (siehe unten und 4.2.1.2) zu Störungen im Membranpotential, was sich zwangsläufig auch auf den Energiehaushalt der Zelle, das Lyse-Verhalten und den mit letzterer verbundenen Verlust energiereicher Nukleotide auswirkt.

Vieles spricht dafür, dass der Stickstoffmetabolismus in *S. pneumoniae* eine regulatorische Funktion ausüben könnte. Bemerkenswerte 10 % der Gene für Transporter im Pneumokokken-Genom sind als Glutamin-Importer annotiert (Hoskins *et al.*, 2001). In den hier durchgeführten Transkriptomanalysen sind Gene für die Verstoffwechslung von Glutamin und Arginin mehrfach transkriptionell in Erscheinung getreten. Zahlreiche Studien deuten auf eine Beteiligung des Stickstoffstoffwechsels, vornehmlich des Glutamin- und Arginin-Stoffwechsels an Virulenz und Säurestress in *S. pneumoniae* hin (Hava und Camilli, 2002; Kloosterman *et al.*, 2006). Zudem existieren Evidenzen für eine Assoziation mit der genetischen Kompetenz (siehe 4.2.3). So geht von Oligopeptiden und deren Import-Proteinen, wie dem Ami-Transportsystem, für das die entsprechenden Gene auch in dieser Arbeit immer wieder signifikant transkribiert wurden, ein erheblicher Einfluss auf die Kompetenz aus (Alloing *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1996; Alloing *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass Oligopeptid-Permeasen durch die Bereitstellung von Information über die Nährstoff- und Energieverfügbarkeit als zentrale Elemente der metabolischen Regulation in *S. pneumoniae* agieren. Diese Signale könnten durch einen noch unbekanntem transkriptionellen Regulator, welcher die bei dem Verdau von importierten Peptiden freigesetzten Aminosäuren detektiert, in den Kompetenz-Ablauf integriert werden (Claverys *et al.*, 2000; Lazazzera und Grossman, 1998). Zu beachten gilt, dass es sich bei dem Kompetenz-Induktor CSP ebenfalls um ein Oligopeptid handelt. Einen weiteren Beweis für die Verbindung von Stickstoffmetabolismus und Kompetenz liefert die Fülle an CSP-induzierten Stickstoff-Genen, die bei Transkriptomanalysen sichtbar wurde (Bartilson *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1998; Claverys und Martin, 1998; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Håvarstein, 1998; Peterson *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000). Bezeichnend ist dabei auch, dass die Gene *comAB* für das CSP-Sekretionssystem unmittelbar vor dem *pur*-Cluster im Genom lokalisiert sind (siehe oben). In *Haemophilus influenzae*, einem anderen natürlich kompetenten Bakterium, sind mehrere Kompetenz-Gene dem Purin-Regulon unterstellt und die Kompetenz-Entwicklung wird durch den Nukleotid-Pool reguliert (MacFadyen *et al.*, 2001). Im Rahmen der Untersuchung von Mutanten mit hochregulierten *comCDE*-Genen (competence up (*cup*)-Mutanten) konnten einige mit Insertionen in Genen des Purinstoffwechsels identifiziert werden. Darunter befanden sich auch die einige Male signifikanten Gene *guaA* und *guaC* für die Enzyme zur Umwandlung von Xanthosinmonophosphat (XMP) zu Guanosinmonophosphat (GMP) bzw. GMP zu IMP. Guanin-Nukleotiden, wie dem Guanosin-3',5'-bispyrophosphat ((p)ppGpp), wird eine Bedeutung als interne Stress-Signale zugesprochen und eine von ihnen ausgehende Regulation der Kompetenz,

die ja als Stress-Antwort interpretiert werden kann, steht schon seit langem in Diskussion (Claverys und Håvarstein, 2002). In diesem Kontext wird oft die „DNA-als-Essen“-Hypothese genannt, welche besagt, dass Kompetenz in *S. pneumoniae* der Versorgung mit Nährstoffen aus der aufgenommenen und anschließend katabolisierten DNA dient (Dubnau, 1999; Dubnau und Lovett, 2002; Guiral *et al.*, 2006). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass „Hunger“ einen allgemeinen Stress-Faktor repräsentiert, der wie ein Dutzend weiterer Stress-Einflüsse den kompetenten Zustand induziert (siehe 4.2.3) (Claverys *et al.*, 2006). Interessanterweise inhibiert (p)ppGpp in *E. coli* das Hauptautolysin SLT (Betzner *et al.*, 1990), aktiviert die Transkription des Gens für das Zellteilungspolypeptid FtsZ (Vinella *et al.*, 1992; Vinella *et al.*, 1993) und ist in die stringente Kontrolle der Peptidoglykanbiosynthese involviert (Ishiguro und Ramey, 1976; Kusser und Ishiguro, 1987; Vanderwel und Ishiguro, 1984). Überhaupt spielen gerade die Nukleotide ATP und GTP als Phosphatgruppen-Lieferanten eine große Rolle bei der Signaltransduktion innerhalb von Zwei-Komponenten-Systemen und regulatorischen Protein-Familien wie den Eukaryoten-ähnlichen Serin/Threonin-Kinasen/Phosphatasen und GTPasen. Solche Systeme werden vermehrt für die kompensatorischen Anpassungen an die β -Laktam-Resistenz gebraucht. In *S. pneumoniae* reguliert das Serin/Threonin-Kinase/Phosphatase-Paar StkP/PhpP eine Vielzahl an zellulären Vorgängen, wie Kompetenz (Echenique *et al.*, 2004; Osaki *et al.*, 2009; Sasková *et al.*, 2007), Virulenz (Echenique *et al.*, 2004), Metabolismus (auch den Purin- und Pyrimidinmetabolismus) und oxidative Stress-Antwort (Sasková *et al.*, 2007). Ähnlich wie PBP enthalten Serin/Threonin-Kinasen sogenannte PASTA-Domänen (siehe 1.3), welche vermutlich unverknüpftes Peptidoglykan binden und dadurch die Lokalisation des PBP bzw. der Zellteilungsmaschinerie steuern (Yeats *et al.*, 2002). StkP sorgt offenbar für den Schutz der Zellwand-Integrität, da Mutationen in dieser Kinase eine Hypersensitivität gegenüber Zellwand-Inhibitoren zur Folge haben (Echenique *et al.*, 2004; Jones und Dyson, 2006; Sasková *et al.*, 2007). Bei Kulturen, die mit subletalen Penicillin-Konzentrationen behandelt wurden, kam es zu einer Abnahme der Transkription von Kompetenzgenen (Rogers *et al.*, 2007). Aus diesen Befunden wurde geschlossen, dass StkP einen weiteren Modulator der Kompetenz vertritt, welcher periplasmatische Signale, wie Zellwandschäden in das „Kompetenzgeschehen“ eingliedert (siehe 4.2.3) (Osaki *et al.*, 2009). Ein solches Zusammenspiel könnte auch im Fall der analysierten Mutanten vorliegen, allerdings fanden sich weder Hinweise auf eine verstärkte Bildung von StkP/PhpP noch von (p)ppGpp, wie z. B. eine erhöhte Transkriptmenge der Gene für StkP/PhpP oder für die Syntheseenzyme von (p)ppGpp RelA und Spr1004 (Kazmierczak *et al.*, 2009).

Auffallend war an zweiter Stelle der Glycero(phospho)lipidmetabolismus bei der globalen Transkriptomanalyse. Diese Gene codieren für Enzyme, welche die Synthese von Glycerophosphat und Glycerin-3-phosphat katalysieren, die Vorstufen der beiden Membranlipide von *S. pneumoniae*, der (Glycero)phospho- und Glycolipide (Brundish *et al.*, 1965a, b). Fast ausschließlich in den

Mutanten R6_{pbp2xT338G}, R6_{pbp2x2349}, R6_{pbp2x2349pbp1a2349}, C402 und C606 bei 37 °C vertreten, präsentierten sich die Gene mit einer durchgehend reduzierten Transkriptionsrate. Die Signifikanz dieses Metabolismus läßt auf Modifikationen in der Phospho- und Glycolipid-Komposition der Cytoplasmamembran schließen. Diese hat Einfluss auf eine Fülle von physiologischen Prozessen; um nur einige zu nennen: Aktivierung und Lokalisation von Membran-gebundenen Proteinen (wie PBP), Transmembrantransport und Antwort auf verschiedene Stressbedingungen (Dowhan, 1997). Die Tatsache, dass sich Gene für Transport- und Quorum-Sensing-Systeme, wie das Kompetenz- und Bacteriocin-Regulon, welche in hohem Maße auf eine intakte Biochemie der Membran angewiesen sind, durchweg auf transkriptioneller Ebene bemerkbar machten, spricht für eine Beeinträchtigung von letzterer. Obendrein besteht der Lipidanker der LTAs aus einem Glycolipid (Neuhaus und Baddiley, 2003), sodass hier ebenfalls mit Folgen zu rechnen ist. Die Repression der Gene für die Glycolipid-Synthese könnte jedoch auch als Antwort auf die mögliche Verschiebung des regulatorisch aufrechterhaltenen WTA/LTA-Gleichgewichts in der Zellwand (siehe 4.2.1.2) gedeutet werden.

Die Regulation des Verhältnisses der Phospho- und Glycolipide in der Membran stellt ein wichtiges Instrument der Adaption auf Umwelteinflüsse in Bakterien dar. So trägt sie z. B. zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität in Abhängigkeit von der Temperatur bei. Bei der Gegenüberstellung des Transkriptom von C606 bei 30 und 37 °C war zu erkennen, dass Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus, für Osmoprotektion-, Hitzeschock- und Stressproteine bei einer Temperatur von 37 °C weniger transkribiert wurden. Sollte etwa der Grund für das schlechtere Wachstum und die MHK-Tempersensitivität der Mutante C606 bei 37 °C in einer mangelnden Anpassung der Membran an diese Temperatur liegen? Immerhin wurde die Mutante ursprünglich bei 30 °C selektioniert.

In die Gruppe der ABC-Transporter, welche in den einzelnen Mutanten zum Teil sehr unterschiedlich reguliert wurden, reihten sich erstaunlich viele Mobilisierungs- und Aufnahmesysteme für ein- und zweiwertige Kationen, Phosphat und Oligopeptide ein. Zum einen erscheint es nachvollziehbar, dass durch Veränderungen des metabolischen Flusses auch die Ausstattung der Transportproteine für die zur Aktivität vieler Enzyme benötigten Cofaktoren angepasst sein muß. Zum anderen könnte hier aber auch wieder ein Indiz für Unstimmigkeiten im Membranpotential bzw. WTA/LTA-Verhältnis der Zellwand zu sehen sein. Durch ihre Eigenschaft freie Mg²⁺-Ionen aus der Umgebung zu rekrutieren, sind TAs ein Cofaktor-Reservoir für enzymatische Reaktionen und tragen dazu bei den für den Austausch von Stoffen und die Energiegewinnung unerlässlichen Protonengradienten über der Membran – vorausgesetzt sie ist nicht beeinträchtigt – zu erhalten (Archibald, 1988; Doyle, 1989; Hughes *et al.*, 1973; Lambert *et al.*, 1975).

Die Kompetenz wird unter anderem von der Konzentration zweiwertiger Kationen (siehe oben) (Dintilhac *et al.*, 1997; Seto und Tomasz, 1976; Tomasz und Hotchkiss, 1964), Phosphat (Novak *et*

al., 1999), Oligopeptiden (Alloing *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1996; Alloing *et al.*, 1998; Claverys *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 1994) und dem pH-Wert (Chen und Morrison, 1987; Tomasz und Hotchkiss, 1964) beeinflusst. Kommt hier womöglich ein weiteres regulatorisches Element hinsichtlich der Kompetenz der Mutanten zum Tragen?

Für einige andere Transportsysteme wie das AmiA/AliAB/AmiCDEF (Oligopeptide), Psa (Mn²⁺) und Pst (Phosphat) -System konnte bereits der Nachweis ihrer Beteiligung an Kompetenz (AmiA/AliAB/AmiCDEF (Alloing *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1996; Alloing *et al.*, 1998; Claverys *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 1994), Psa (Dintilhac *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 2002)), Virulenz (AmiA/AliAB/AmiCDEF (Alloing *et al.*, 1990; Cundell *et al.*, 1995), Psa (Berry und Paton, 1996; Dintilhac *et al.*, 1997; Marra *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2002)) und Penicillin-Toleranz und -Resistenz (Psa (Kloosterman *et al.*, 2008; Novak *et al.*, 1998), Pst (Novak *et al.*, 1999; Soualhine *et al.*, 2005)), erbracht werden; ihr hiesiges Auftreten ist demnach auch nicht weiter verwunderlich.

4.2.2 PBP2x-Mutationen und das Zwei-Komponenten-System CiaRH

Insgesamt deuten die in 4.2.1.1, 4.2.1.2 und 4.2.1.3 skizzierten Befunde darauf hin, dass Mutationen in PBP2x weitreichende Folgen für die Funktion des Proteins und die Zellphysiologie haben. Wurden solche Mutationen nun erst mit einem nichtfunktionellen Zwei-Komponenten-System CiaRH kombiniert, kam das gesamte Ausmaß auf dramatische Art und Weise zum Vorschein. Die Mutanten zeigten eine weitere Erhöhung der Generationszeit und Verminderung der maximalen Zelldichte, eine verkürzte bzw. fehlende stationäre Phase und insbesondere eine verstärkte Autolyse. Zugleich äußerte sich vermehrt eine Beeinträchtigung der Zellmorphologie und -vitalität. Wie bereits für die Ausgangsmutanten konstatiert, hing die Stärke des Effekts, erstens, von der Art der PBP2x-Mutation ab – PBP2x-Mosaik oder -Punktmutation – und zweitens, von der Punktmutation selber, wobei hier der Schweregrad mit dem Resistenzpotential korrelierte (siehe 4.2.1.1). Während sich die Inaktivierung von CiaRH in den PBP2x-Punktmutanten R6_{pbp2xT338A}, R6_{pbp2xT338P}, R6_{pbp2xT338G} und C303 zum Teil gravierend auf die Zellintegrität auswirkte, brachte sie für das Wachstum der PBP2x-Mosaik-Transformante R6_{pbp2x2349} nahezu keine Einschränkungen mit sich. Dem vermittelten Resistenzniveau entsprechend waren die Auswirkungen bei R6_{pbp2xT338G} und C303 am ausgeprägtesten. Ähnliche Phänotypen und Unterschiede bezüglich der einzelnen PBP2x-Substitutionen wurden für andere PBP2x-Labormutanten dokumentiert (Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Offensichtlich sind PBP2x-Veränderungen nur mit einem funktionsfähigen CiaRH-System tolerierbar, welches in der Lage ist die durch sie hervorgerufenen Defekte zu kompensieren. Dabei schien zu gelten, dass je größer das Resistenzpotential einer PBP2x-Mutation, desto größer ihr Einfluss auf die Zelle, desto größer die Notwendigkeit eines intakten CiaRH-Regulationssystems und dementsprechend die Auswirkungen bei seinem Wegfall. Es er-

scheint einleuchtend, dass gerade eine Punktmutation an Position 338 im PBP2x die Funktionalität des Proteins entscheidend beeinflusst, befindet sie sich doch an einer für ein Enzym kritischen und empfindlichen Stelle, nämlich unmittelbar neben der katalytischen Gruppe. Für die in C303 vorkommenden Mutationen T550A und G597D wurde bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass sie die Transpeptidase-Aktivität von PBP2x maßgeblich beeinträchtigen (siehe 4.2.1.2). Dass es sich hierbei um folgenreiche Mutationen handeln mußte, ließ schon die nur über einen Umweg realisierte Selektion der R6_{p_{bp2x}C303}-Transformante und die Anfälligkeit von C303 für möglicherweise kompensierende CiaH-Austausche erahnen. Auch der mit diesen beiden PBP2x-Substitutionen erzielte Resistenzanstieg, der den bisher höchsten mit einer solchen Konstellation repräsentiert, sprach für die Tragweite der Mutationen. Auffällig ist, dass T550A in keiner der C-Labormutanten-Familien als erste PBP2x-Aminosäuresubstitution auftritt, sondern ihr immer eine am C-terminalen Ende der Transpeptidase-Domäne vorangeht. Das spiegelte sich auch in der Selektionierbarkeit der PBP2x_{C303}-Mutationen wider. Einzeln konnten beide problemlos selektioniert werden; um sie in Kombination zu erhalten, mußte zunächst G597D präsent sein, bevor es möglich war T550A zu integrieren. Augenscheinlich folgt die Einführung von Mutationen in PBP2x einer ganz bestimmten Reihenfolge, wobei die vorherige Substitution die Position der folgenden festlegt. Vielleicht ist aber auch einfach nur die mit T550A erzielte deutlich höhere Resistenz dafür verantwortlich, dass T550A immer vor G597D selektioniert wird. Bezeichnend ist, dass die T550A-Mutation zwar auch in klinischen Isolaten anzutreffen ist, allerdings nur in seltenen Fällen. Sie bewirkt eine ungewöhnlich hohe Cefotaxim-Resistenz, gleichzeitig aber eine Hypersensitivität gegenüber Penicillinen (Asahi *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991; McDougal *et al.*, 1995; Mouz *et al.*, 1999; Sifaoui *et al.*, 1996), was in dieser Arbeit mit Cefotaxim und Oxacillin, einem Penicillin, bestätigt werden konnte.

Die nur geringfügigen Wachstumseinbußen bei Inaktivierung des CiaRH-Systems im genetischen Hintergrund des klinischen Mosaik-PBP2x läßt auf die Präsenz von kompensatorischen Mutationen in diesem Protein schließen, welche das Resultat der Evolution von klinischen Isolaten außerhalb des Labors darstellen. Da leider noch kein *in vitro*-Testsystem für die Transpeptidase-Reaktion von PBP mit natürlichen Muropeptid-Substraten zur Verfügung steht, kann momentan nur die Analyse der Zellwand-Zusammensetzung, also des Endergebnisses, Hinweise auf eine gestörte enzymatische Aktivität eines PBP2x liefern. CiaRH könnte dabei als erster Detektor solcher funktioneller Defizite dienen. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, die Struktur des PBP2x von Labormutanten mit der von Mosaik-PBP2x (Dessen *et al.*, 2001; Pernot *et al.*, 2004) zu vergleichen.

Im Zuge der Untersuchungen zur Aktivierbarkeit von CiaRH stellte sich heraus, dass dieses System durch PBP2x-Mutationen auf transkriptioneller Ebene aktiviert werden kann. Voraussetzung hier-

für war allerdings das Vorliegen eines mutierten *ciaH*-Allels; das Wildtyp-Allel reagierte nicht auf die Anwesenheit von PBP2x-Substitutionen (Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2006). Demzufolge könnte nun angenommen werden, dass sich die Abhängigkeit eines *pbp2x*-Allels von CiaRH auch in der Stärke der Expression Cia-regulierter Gene bemerkbar macht. Überraschenderweise war aber in keiner der auf Transkriptomebene analysierten PBP2x-Labormutanten, ausgenommen einer einzigen (C402), eine gesteigerte Transkription des Cia-Regulons zu erkennen. Im Gegenteil, in der Mehrheit der Fälle befanden sich entweder gar keine Gene dieses Regulons unter den signifikant transkribierten, oder aber sie wurden sogar weniger exprimiert. Zumindest bei R6_{*pbp2x*T338G} und R6_{*pbp2x*2349}, C106, C206 und C301 war diese Beobachtung, ähnlich wie bei R6_{*pbp2x*C303} (Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2006), auf das nicht zur Aktivierung prädestinierte Wildtyp-CiaH in diesen Mutanten zurückzuführen. Warum aber äußerte sich in den Mutanten C306, C406, C506 und C606 keine erhöhte Transkriptmenge von *cia*-Genen, verfügten diese doch gerade über das „berühmte“ *ciaH*_{C306}-Allel, welches CiaRH in einen aktivierten Zustand („ON“-Zustand) versetzen soll (Guenzi *et al.*, 1994; Guenzi und Hakenbeck, 1995; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002)? Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die in der C006-Reihe auftretenden PBP2x-Austausche „harmlos“ sind, d. h. keine schwerwiegenden Folgen für die Zelle mit sich bringen und diese demnach auch nicht in dem Maße auf CiaRH angewiesen ist. Denkbar wäre auch, dass selbst von den mutierten *cia*-Allelen nur ganz bestimmte durch PBP2x-Mutationen aktiviert werden können bzw. bei ihnen eine Aktivierung für die Zelle Sinn macht. Hierzu zählen beispielsweise das *ciaH* der Mutante C202, bei dem in der Tat eine deutliche Zunahme der Transkription CiaRH-abhängiger Gene in Gegenwart zweier PBP2x-Austausche vorgefunden wurde, oder dasjenige von C103 (Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2006). Diese *ciaH*-Allele brachten im Kontext mit PBP2x-Substitutionen offenbar Vorteile für die Zelle, wie die charakteristisch verlängerte stationäre Wachstumsphase der Mutanten C302, C402 und C303 demonstrierte (diese Arbeit) (Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Andere wiederum, wie das *ciaH* von C306, erweckten den Anschein, als ob sie sich eher nachteilig auswirkten. So war im Wachstumsverhalten der C006-Familie eine signifikante Verkürzung der stationären Phase bei Einführung dieses Allels zu verzeichnen. Allerdings kann die verzögerte Lyse in C303 auch auf der zusätzlich vorhandenen Punktmutation in dem CiaH dieser Mutante beruhen. Ihr Muropeptidprofil ließ die stärksten Modifikationen aller PBP2x_{C303}-enthaltenden Stämme erkennen. Demnach schien der Profit von *ciaH*-Allelen hauptsächlich dem Lyseverhalten zugute zu kommen. Bisherige Analysen beschränkten sich ausschließlich auf einen Stamm mit dem *ciaH*_{C306}-Allel und definierten diesen aufgrund der dort beobachteten verstärkten Aktivität von CiaRH als „ON“-Mutante (siehe oben) (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Guenzi und Hakenbeck, 1995; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002). Da die analysierte Ursprungsmutante C306 aber zusätzlich zwei Aminosäureaustausche in PBP2x enthielt, sind die Daten der „ON“-Mutante nicht ohne Weiteres auf C306 übertragbar. Überhaupt stellt sich die Frage, ob bei einer 3 bis 5fach höheren Transkriptionsrate von zwei der

am stärksten Cia-abhängigen Genen (Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003) von einem „ON“-Zustand gesprochen werden kann. Darüber hinaus fiel bei diesem Stamm eine hohe genetische Instabilität auf (Kovács, 2009); und es ist nicht auszuschließen, nein sogar naheliegend, dass zusätzliche Substitutionen in CiaH das Regulon aktivieren. Im Vergleich zu anderen, teilweise bis zu 350fach differentiell exprimierten Genen und Gen-Clustern in den Labormutanten, fiel aber selbst in C202, der Mutante mit der momentan höchsten gemessenen Aktivität CiaRH-regulierter Promotoren (Müller, persönliche Mitteilung), die Transkription dieser Gene mit einer 5fachen Erhöhung etwas bescheiden aus. Immerhin verdoppelte sie sich mit dem Hinzukommen zweier PBP2x-Substitutionen in C402. In diesem Zusammenhang wird oft argumentiert, dass CiaRH bereits unter normalen Wachstumsbedingungen im Labor aktiviert vorliegt, demnach auch keine große Steigerung mehr zu erwarten ist und dieses basale Niveau ausreicht, um genügend Protektion in Gegenwart von PBP2x-Mutationen zu bieten (Halfmann, 2008; Halfmann *et al.*, 2007; Mascher *et al.*, 2006). Sehr hoch darf dabei der Grad der Aktivierung allerdings nicht sein, sonst wären wohl alle Laborstämme, insbesondere PBP2x-Mutanten kaum noch transformierbar, da dieses Zwei-Komponenten-System die Kompetenz inhibiert. Tatsächlich können jedoch die meisten Stämme ohne Probleme und mit großer Ausbeute transformiert werden. Zudem würde in Mutanten wie C606 und C405, in denen ein Abbau von PBP2x durch die von CiaRH kontrollierte Serin-Protease HtrA nachgewiesen wurde (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009), eine permanente Degradation eines essentiellen Proteins stattfinden.

Eine weitaus plausiblere Erklärung für die fehlende transkriptionelle Aktivierung von CiaRH in den Mutanten C306, C406, C506 und C606 ist, dass eine Mobilisierung dieses Systems nur zu dem Zeitpunkt im Wachstum erfolgt, an dem es auch wirklich gebraucht wird, nämlich in der stationären Phase. Da die zur Transkriptomanalyse eingesetzte RNA in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von 40 gewonnen wurde, kann folglich keine Aussage über die Transkription von Genen in der stationären Wachstumsphase getroffen werden. In einer Transkriptomstudie, mehreren Reporter- und β -Galaktosidaseassays wurde gezeigt, dass es in dieser Phase zu einem geringen Anstieg der Expression Cia-abhängiger Gene im Wildtyp kommt (Halfmann, 2004, 2008; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003). Auch in C405 und C606 wurde in der stationären Wachstumsphase ein noch stärkerer Abbau von PBP2x durch HtrA detektiert als in der logarithmischen Phase (Peters, 2009). Der bei Aktivierung eines *ciaH*-Allels oder Inaktivierung von *ciaR* markanteste Effekt, die verzögerte oder verstärkte Lyse, spielt sich ebenfalls erst dann ab. Wie das Wachstum in Abwesenheit von CiaRH und ComAB belegte, kann letztere im Wildtyp vollständig der Kompetenz zugeschrieben werden (diese Arbeit) (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004), sodass davon auszugehen ist, dass die Hauptfunktion des Cia-Regulons darin besteht, einen kontrollierten Ablauf der für Pneumokokken typischen „Autolyse“, also der „Kompetenzlyse“, zu gewährleisten. Unter dem Gesichtspunkt, dass es sich bei der Kompetenz um einen vom Medium abhängigen Prozess handelt, würde das auch die

Schwankungen in der Ausprägung der Lyse bei einer *ciaR*-Unterbrechung in verschiedenen C-Medien erklären. Zahlreiche Studien weisen daraufhin hin, dass CiaRH benötigt wird, um mit den physiologischen Veränderungen während der Kompetenz zurechtzukommen und diesen Zustand unversehr wieder zu verlassen (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Echenique *et al.*, 2000; Guenzi *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003). Zudem gehört dieses System zu den verzögert induzierten Kompetenzgenen und wird damit von ComDE reguliert (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004; Rimini *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass kompetente und sich in der stationären Phase befindende Zellen über eine biochemisch veränderte Zellhülle verfügen (Glauner *et al.*, 1988; Seto und Tomasz, 1975; Tomasz und Zanati, 1971; Warth und Strominger, 1972). Die bei *ciaR*-Inaktivierungsmutanten mit PBP2x-Mutationen über das Wildtyp-Niveau hinausgehende Autolyse könnte auf zusätzlichen durch PBP2x verursachten Schäden in der Zellwand und -membran basieren, welche sich je nach Mutation unterschiedlich stark äußern. Diese würden sich im Verlauf des Wachstums anhäufen und erst in der stationären Wachstumsphase bzw. am Ende des kompetenten Zustands, wenn die Zellhülle sowieso schon geschwächt ist, sichtbar und von CiaRH wahrgenommen werden (siehe unten und 4.2.3). Nur bei einer Schwächung der Zellmembran und folglich auch zu diesem Zeitpunkt verläßt das wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisierte LytA die Zelle, um an sein Peptidoglykan-Substrat zu gelangen (Díaz *et al.*, 1990; Eldholm *et al.*, 2009; García *et al.*, 1999; Tomasz und Waks, 1975). Größere Schädigungen der Membran könnten dazu führen, dass mehr LytA nach außen gelangt und die Lyse damit noch verstärken.

Für die oben beschriebene Hypothese sprechen auch die Ergebnisse der Zellwand-Analyse von C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*p_bp2xC303*}, bei der ebenfalls kein Eingreifen dieses Zwei-Komponenten-Systems festgestellt wurde. Das verwundert, da doch im Transkriptionsmuster der C003-Reihe bei einer Zelldichte von 40 eine kontinuierliche Steigung der Transkription von *cia*-Genen zutage trat (Heintz, 2006), und sich eine Unterbrechung von *ciaR* in C303 als desaströs erwies (diese Arbeit) (Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Eine logische Antwort auf diesen scheinbaren Widerspruch liefert auch hier die Annahme, dass in der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Zellen für die Präparation der Zellwand geerntet wurden, keine Einflussnahme, weder positiver (Kompensierung) noch negativer (Verstärkung der Defekte bei *ciaR*-Inaktivierung) Natur, von CiaRH zu erwarten ist. Überhaupt ist fraglich, ob sich eine Kompensierung in einer „Reparatur“ der Zellwand manifestiert oder vielmehr darauf abzielt, der Autolyse (Kompetenzlyse) entgegenzuwirken. Auf diesen wichtigen Aspekt, der auch die transkriptionelle Aktivierung in den C003-Mutanten begründet, wird in 4.2.3 näher eingegangen.

Fast alle Cia-abhängigen Phänotypen und Zielgene stehen in Verbindung mit der Zellhülle, sodass davon ausgegangen werden kann, dass CiaRH auch hier ein Signal perzipiert und kompensatorisch interveniert. Die Tatsache, dass CiaH-Substitutionen mit einem β -Laktam, einem strukturellen

Analog eines Muropeptid-Teils, selektioniert wurden, könnte darauf hindeuten, dass dieses System Muropeptid-Komponenten detektiert (Guenzi *et al.*, 1994). Folglich kann es auf die durch ein mutiertes PBP2x bedingten biochemischen Veränderungen in der Zellwand, wie ein schwach vernetztes Peptidoglykan, unmittelbar reagieren (siehe 4.2.1.2). Vorstellbar wäre auch, dass CiaRH über die Protease- bzw. Chaperonaktivität von HtrA agiert (Mascher *et al.*, 2006). Die Proteine der Zellwandsynthesemaschinerie liegen bei der Zellteilung in Multienzymkomplexen vor, für deren Bildung Chaperone benötigt werden (Höltje, 1996a, 1998). Ein PBP2x mit Mutationen, welche die Proteinstabilität, -faltung bzw. -wechselwirkungen beeinträchtigen, könnte somit von HtrA erkannt, renaturiert oder prozessiert werden, was den reibungslosen Ablauf der Zellwandsynthese garantiert. Ein bedeutendes kompensatorisches Bindeglied zwischen der für *ciaR*-Inaktivierungsderivate mit PBP2x-Substitutionen typischen verfrühten Autolyse und CiaRH dürfte das an der Cholin-Substitution und Biosynthese von TAs beteiligte *lic1*-Operon repräsentieren. Da das Pneumokokken-Hauptautolysin LytA erst durch Bindung an die Cholinreste der WTAs aktiviert wird (García *et al.*, 1987; Höltje und Tomasz, 1976; Tomasz und Westphal, 1971; Usobiaga *et al.*, 1996), ist die Autolyse auf strukturell intakte, mit Cholin substituierte TAs angewiesen. Fernerhin ist Cholin in den TAs zur Ausbildung der genetischen Kompetenz notwendig (siehe 4.2.3) (Tomasz, 1968; Zhang *et al.*, 1999). Die Aktivierung von LytA kann durch einen Cholin-Überschuss oder einen zu hohen Anteil von mit Cholin modifizierten LTAs gehemmt werden (Briese und Hakenbeck, 1983, 1985). Die Cia-abhängige Expression des *lic1*-Locus wird im Wildtyp erst in der spätlogarithmischen Wachstumsphase induziert (Halfmann, 2008; Mascher *et al.*, 2003) und gerade dann könnte der vermehrte Einbau von Cholin in die TAs der LytA-vermittelten Autolyse und Kompetenz entgegenwirken.

Was Cholin anbelangt, so hat diese Substanz in hoher Konzentration einen großen Einfluss auf die Zellphysiologie und Zellwand-Zusammensetzung. Sowohl bei den C003-Derivaten als auch bei R6 stellte sich bei Zusatz von 2 % Cholinchlorid zum Medium eine Erhöhung der Generationszeit, maximalen Zelldichte (Erniedrigung bei R6) und Dauer der stationären Phase ein. Weiterhin trat im Zellwand-Muropeptidprofil ähnlich wie im Murein-Profil eine drastische Zunahme der Monomere auf, wobei diese sich diesmal nicht nur auf die Stämme mit PBP2x_{C303} beschränkte, sondern auch auf C103 übergriff und hier sogar am ausgeprägtesten war. Im Gegensatz zu dem Murein waren jedoch fast ausschließlich Tripeptide betroffen; die Menge der Pentapeptide blieb weitgehend konstant. Die Ursache hierfür ist möglicherweise eine reduzierte Transpeptidierung und gleichzeitig gesteigerte D,D-Carboxypeptidierung durch PBP3, die zu einer Anhäufung von Tetrapeptiden führt, welche in Pneumokokken weiter zu Tripeptiden getrimmt werden. Das könnte auf eine generelle Störung in der Koordination von Zellwandsynthese und -hydrolyse hinweisen, welche aus der Inhibition der lytischen Enzyme in diesem Medium resultiert und sich auch auf das den Zellteilungsprozess steuernde PBP3 (Morlot *et al.*, 2004) erstreckt. Dass R6 keinerlei Aberrationen aufwies, zeugte davon, dass die Mutanten vermutlich aufgrund ihrer genetischen Dis-

position anfälliger hierfür waren. Vor diesem Hintergrund dürfen die Resultate der Untersuchungen zur Zellmorphologie und Lebensfähigkeit der PBP2x-Mutanten mit fehlendem CiaRH-System (siehe oben) nur mit Vorsicht interpretiert werden. Beruht die Beeinträchtigung der Morphologie und Vitalität dieser Zellen wirklich einzig und allein auf dem inaktiven Cia-Regulationssystem oder spielt womöglich die ungewöhnlich hohe Cholin-Konzentration auch noch eine Rolle? Das morphologische Erscheinungsbild dieser Zellen erweckte den Eindruck, als ob die Zellteilungsebene nicht richtig platziert werden kann. Diese Defekte könnten zum einen von dem veränderten PBP2x herrühren, welches in das septale Zellwandwachstum (Zellteilung) involviert ist, zum anderen aber auch von PBP3 (siehe oben). Fakt ist, dass LTAs in einigen Gram-positiven Bakterien ebenfalls zur Positionierung der Teilungsebene beitragen (D'Elia *et al.*, 2006; Grundling und Schneewind, 2007).

4.2.3 PBP2x-Mutationen und die genetische Kompetenz

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von CiaRH zu einer Inhibition der Kompetenz führt, während bei funktionslosem Cia-System eine Dereprimierung erfolgt (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Guenzi und Hakenbeck, 1995; Heintz, 2006; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Merai, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002). Die Genexpressionsmuster aller in dieser Arbeit analysierten Mutanten ausgenommen C202 und C402 lieferten jedoch keinerlei Hinweis auf einen reprimierenden Effekt von CiaRH auf die Kompetenz. Dieses System wurde entweder überhaupt nicht differentiell oder weniger exprimiert; trotzdem war eine eindeutig verringerte Transkriptmenge von Kompetenzgenen zu verzeichnen. In den meisten Fällen wurde sogar in Übereinstimmung mit der verzögerten Induktion der *cia*-Gene *ciaR*, *ciaH*, *sphtra*, *spo0J* und *spr0931* durch CSP (Peterson *et al.*, 2004) eine umgekehrte Einflussnahme beobachtet.

Aber wie läßt sich dieser Widerspruch, ein phänotypischer Kompetenzverlust durch ein aktiviertes Cia-Zwei-Komponenten-System einerseits, aber eine Reduktion der Transkriptionsrate des Kompetenz-Regulons, welche nicht CiaRH zugeschrieben werden kann andererseits, erklären? Bisher konnte weder eine CiaR-Bindestelle vor bzw. innerhalb von Kompetenzgenen identifiziert, noch eine direkte transkriptionelle Regulation der Kompetenz durch CiaRH nachgewiesen werden (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003; Zähler, 1999). Somit ist davon auszugehen, dass die Cia-abhängige Repression des Kompetenz-Regulons posttranskriptioneller oder –translationeller Natur ist (siehe unten). Die ab einer bestimmten Selektionsstufe in den sechs C-Familien auftretende Kompetenzdefizienz ist in vier Familien notwendigerweise an eine Kombination aus CiaH- und PBP2x-Mutation gekoppelt und wird nur in zwei Familien (C002 und C006) allein durch ein verändertes *ciaH*-Allel bewirkt (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*,

1996). Trotzdem machte sich lediglich eine leichte Abnahme der Transkription von Kompetenzgenen bemerkbar, wenn nur das jeweilige Allel präsent war (diese Arbeit) (Heintz, 2006; Mascher, 2001). Kamen jedoch PBP2x-Mutationen hinzu, so konnte ein massiver Abfall in der C002- und C003-Reihe festgestellt werden (diese Arbeit) (Heintz, 2006). Für die C006-Mutanten spielte es dagegen keine Rolle, ob das *ciaH*-Allel anwesend war oder nicht; hier genügten zwei PBP2x-Substitutionen, um die Kompetenz niedrig zu halten. Diese Befunde deuten erstens auf ein Zusammenspiel zwischen CiaRH und PBP2x bei der Kontrolle der Kompetenz und zweitens auf eine Cia-unabhängige Beeinflussung letzterer durch PBP2x hin. Tatsächlich bestätigte die Bestimmung der Transformationseffizienz der R6_{p_bp2xT338}-Mutanten und von R6_{p_bp2x2349}, dass das Kompetenzmuster bzw. -ausmaß von dem jeweiligen PBP2x moduliert wird. Dass diese Modulation von CiaRH entkoppelt ist, wurde aus dem Fehlen von Cia-regulierten Genen im Transkriptomprofil von R6_{p_bp2x2349} geschlossen. Um einen endgültigen Beweis für eine eigenständige Regulation der Kompetenz durch PBP2x zu erhalten, müßte die Transformationseffizienz der entsprechenden *ciaR*-Inaktivierungsderivate überprüft werden. Tritt hierbei das gleiche Verhalten – zumindest am am Beginn und während des exponentiellen Wachstums – zutage, kann sicher von einem solchen Mechanismus ausgegangen werden. Für seine Existenz spricht auch die bei der Inaktivierung von *comAB* und *ciaR* in PBP2x-Mutanten bleibende „Restlyse“ (siehe 4.2.2). Sollte diese immer noch von der Kompetenz herrühren, was zwar angesichts der Kompetenzdefizienz der Mutanten unwahrscheinlich war, aber leicht durch eine *comE*-Inaktivierung zu überprüfen ist, würde das implizieren, dass PBP2x über einen CSP-unabhängigen Weg ComDE anschalten kann (siehe 4.4). Ein solches Phänomen wurde in *S. pneumoniae* für Säure-Stress beschrieben (Piñas *et al.*, 2008). Diese Hypothese schließt ein, dass die durch ein mutiertes PBP2x verursachten Veränderungen in Zellwand-, Membranintegrität, WTA/LTA-Verhältnis und Metabolismus als regulatorisches Bindeglied fungieren (siehe 4.4). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Nährstoff-Verfügbarkeit, Zellwand- und Membranlipid-Zusammensetzung die Kompetenz maßgeblich beeinflussen (siehe 4.2.1) (Claverys und Håvarstein, 2002). Es wird postuliert, dass die Kompetenz in *S. pneumoniae*, als Ersatz für eine fehlende SOS-Antwort, wie sie in *E. coli* zu finden ist, dient (Claverys *et al.*, 2006; Gasc *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1995). Bei Peptiden wie CSP (Claverys und Håvarstein, 2002; Martin *et al.*, 2000), Muropeptiden und importierten Oligopeptiden, TAs, Membranbestandteilen und Antibiotika (Prudhomme *et al.*, 2006) könnte es sich dabei um mögliche Stress-Signale handeln, welche von ComD, CiaH bzw. Oligopeptid-Permeasen perzipiert und in das „Kompetenzgeschehen“ integriert werden (siehe 4.4). Wie die starke Erhöhung der Expression von Kompetenzgenen bei der Gegenüberstellung des Transkriptoms von C606 bei 37 und 30 °C offenbart, spielt auch die Temperatur als Stress-Faktor eine Rolle. Diese Steigerung darf jedoch nicht mit einer Aufhebung des Kompetenzdefizits dieses Stammes bei 37 °C fehlinterpretiert werden. C606 ist bei beiden Temperaturen weiterhin nicht kompetent, da die Transkriptionsrate der Kompetenzgene jeweils unter dem R6-Niveau liegt. Im direkten Vergleich

allerdings befindet sich diese bei 37 über der bei 30 °C, was durch den Stress „mangelnde Anpassungsfähigkeit bei 37 °C“ hervorgerufen wird (siehe 4.2.1.3).

Im Gegensatz zur SOS-Antwort in *E coli* wird der kompetente Zustand in *S. pneumoniae* interessanterweise nicht durch Antibiotika induziert, welche in den Zellwand-Metabolismus eingreifen (Miller *et al.*, 2004; Prudhomme *et al.*, 2006). Unter dem Gesichtspunkt, dass solche Substanzen zum Teil eine hochlytische Wirkung bei Pneumokokken haben, erscheint eine Repression der Kompetenz und damit der Autolyse sinnvoll. Verantwortlich hierfür ist möglicherweise CiaRH, da beispielsweise unter β -Laktam- und Vancomycin-Behandlung eine Abnahme der Transkriptmenge von Genen des Kompetenz-Regulons, aber gleichzeitige Zunahme der *cia*-Genexpression zu erkennen war (Heintz, 2006; Prudhomme *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2007). Eine unzureichende Transpeptidierung durch „schwerwiegende“ *pbp2x*-Allele könnte geringe Konzentrationen solcher Zellwandsynthese-Inhibitoren nachahmen, welche normalerweise als Stress in Form von schwach quervernetzten Muropeptiden die Kompetenz-Kaskade in Gang setzen würden. Ein intaktes Cia-System kann diese Aberrationen jedoch perzipieren und die Kompetenz und Autolyse abschwächen. „Harmlose“ *pbp2x*-Allele vermögen die Kompetenz alleine in Schacht zu halten und sind folglich nur in dem Maße auf die Hilfe von CiaRH angewiesen wie Wildtyp-Allele. Das „in Schacht halten“ könnte durch eine „normale“ Transpeptidase-Aktivität und Quervernetzung eines PBP2x erzielt werden, oder aber durch das Anschalten kompensatorischer Mechanismen. Erstere Annahme mag auf die R6_{*pbp2x2349*}-Transformante zutreffen, welche ein ähnliches Kompetenzverhalten an den Tag legte wie R6. Zweitere Annahme äußerte sich vermutlich in der C006-Reihe und in R6_{*pbp2x2349*} mit der verstärkten Transkription von Genen des Stickstoff-, insbesondere Purinmetabolismus. Ein großer Nukleotid- und Oligopeptidpool in der Zelle signalisiert eine ausreichende Nährstoffversorgung und somit keine Stress-Situation, liefert zugleich aber auch die benötigte Energie für weitere kompensatorische Maßnahmen (siehe 4.2.1.3). Hierbei könnte die in den C006-Mutanten durchgehend weniger transkribierte Gen-Einheit spr0096-spr0110 eine regulatorische Funktion ausüben. Das Cluster vereint Gene des Stickstoffwechsels mit denen für Kompetenz, Bakteriocine und Transkriptionsregulatoren. Auf der einen Seite unterstreicht das Auftreten dieser Gene in noch weiteren unabhängigen Labormutanten-Familien ihre Wichtigkeit im Kontext mit Penicillin-Resistenz (Heintz, 2006; Volz, 2008), auf der anderen Seite gehört die Gruppe als Ganzes nicht zum Kerngenom von *S. pneumoniae* (Brückner *et al.*, 2004), was eine Beteiligung an der Resistenz eher unwahrscheinlich macht. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass diese Gene speziell unter Laborbedingungen und bei hoch-Lyse-sensitiven unbekapselten Stämmen wie R6 eine assistierende Rolle bei der Entwicklung von β -Laktam-Resistenz übernommen haben. Die in der C001-, C002- und C003-Familie anzutreffenden „schwerwiegenden“ PBP2x-Substitutionen sind weniger in der Lage, die Kompetenz zu unterdrücken und demnach auch stärker von CiaRH abhängig. In diesen Mutanten war die Transkriptionsrate von Genen des Stickstoff- bzw. Purinstoffwechsels im Gegensatz zur C006-

Reihe und R6_{pbp2x2349} reduziert (diese Arbeit) (Heintz, 2006). Bei den C002- und C003-Mutanten zeigte sich zudem eine Aktivierung und damit Unterstützung durch das Cia-System bei Anwesenheit der entsprechenden PBP2x-Mutationen. In der C001-Familie konnte dies aber aufgrund des Fehlens einer funktionellen HK CiaH nicht realisiert werden; demnach wurden hier die Gene des Kompetenz-Regulons stärker transkribiert. Da das Autolyseverhalten von C301 und C401 dessen ungeachtet keine Abnormalitäten aufwies, verfügten diese Mutanten entweder über kompensatorische Mutationen (unbekannte Mutation(en) in C201) oder aber das Vorhandensein des RR CiaR reichte für die reprimierende Wirkung auf die Kompetenz aus.

Wie aber gestaltet sich die Kontrolle der Kompetenz in Mutanten wie R6_{pbp2xT338A}, R6_{pbp2xT338P}, R6_{pbp2xT338G} und R6_{pbp2xC303}, welche zwar offensichtlich „schwerwiegende“ PBP2x-Austausche, aber kein aktiviertes *ciaH*-Allel enthielten? Bei den ersten drei Stämmen fiel eine Verschiebung der Kompetenzphase in Richtung niedrigerer Zelldichten und eine deutlich verminderte Transformationseffizienz auf, deren Ausprägung jeweils mit dem Schweregrad der jeweiligen PBP2x-Mutation korrelierte und demnach auf PBP2x zurückzuführen war. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in anderen Labormutanten gemacht (Grebe *et al.*, 1997; Kovács, 2009; Volz, 2008). Wird CiaRH normalerweise am Ende der stationären Phase durch die physiologischen Modifikationen der Zellhülle, welche den kompetenten Zustand begleiten, aktiv, so geschieht dies der Kompetenzphase entsprechend in diesen Mutanten bereits zu einem früheren Zeitpunkt. Das erklärt auch, warum in R6_{pbp2xT338A}, R6_{pbp2xT338P} und R6_{pbp2xT338G} die bei *ciaR*-Inaktivierung sichtbare Kompetenzlyse verfrüht einsetzt. Dabei galt: je früher der Kompetenzpeak, desto früher die Lyse (R6_{pbp2xT338G} > R6_{pbp2xT338P} > R6_{pbp2xT338A}). Allein die Tatsache, dass aber das Wildtyp-CiaH für die Unterdrückung dieser Lyse ausreichend war, lässt darauf schließen, dass eine Aktivierung von CiaRH im Grunde genommen auch bei „schwerwiegenden“ PBP2x-Aminosäuresubstitutionen nicht unbedingt erforderlich ist und in den C-Mutanten lediglich einen „praktischen“ Nebeneffekt (vollständige Inhibition der Kompetenz und damit Kompetenzlyse) der durch CiaH-Mutationen vermittelten Resistenz repräsentiert. Hierfür spricht auch die eher untergeordnete Rolle von CiaH während des exponentiellen Wachstums (Halfmann, 2008).

Die fehlende transkriptionelle Regulation der Kompetenz durch das Cia-System, sowie die in allen C-Mutanten nachgewiesene Komplementierbarkeit der Kompetenzdefizienz mittels externer Zugabe von CSP (Zähler *et al.*, 2002) demonstrieren, dass die Basis-Expression des *comDE*-Operons nicht gestört sein kann und nur der Export, die Stabilität oder die Perzeption von CSP als Angriffspunkte für die Inhibition der Kompetenz durch CiaRH in Frage kommen. So wurde bereits für die Cia-regulierten kleinen nicht-codierenden RNAs 1-5 eine hemmende Wirkung auf die Translation von *comC* und damit auch Kompetenzlyse dokumentiert (Halfmann *et al.*, 2007; Kovács, 2009). Allerdings genügte diese alleine nicht für den Kompetenzphänotyp der Labormutanten aus. Möglich wäre, dass zusätzlich HtrA durch den proteolytischen Abbau von Komponenten wie

ComAB, ComD oder CSP agiert. Diese Theorie wurde für ComD widerlegt, für ComAB und CSP noch nicht bewiesen (Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005). Denkbar sind auch Cia-bedingte Veränderungen der Zelloberfläche, wie Ladungsverschiebungen, welche sich auf die Freisetzung bzw. Erkennung des negativ geladenen CSP auswirken oder aber die Zelle in einen CSP-refraktären Zustand versetzen (Claverys und Håvarstein, 2002; Mascher, 2001; Mascher *et al.*, 2003). Letztendlich kann das Cia-System nicht als der alleinige Inhibitor der Kompetenz angesehen werden. Hierfür müssen Cia-Effekte und Modifikationen in der Zellhülle durch PBP2x zusammenkommen, wobei letztere CiaRH induzieren.

Auf der Basis aller dieser Daten ist es auch einleuchtend, warum in resistenten klinischen Isolaten keine Mutationen in CiaH zu finden sind. Zum einen behindert ein aktiviertes Cia-System die sowieso schon herabgesetzte Kompetenz und damit den Gentransfer und Erwerb von Resistenzdeterminanten, zum anderen wird es hier einfach nicht benötigt. Die Mosaik-PBP und Kapsel sorgen dafür, dass die Kompetenzlyse nicht überhand nimmt, was die charakteristisch verlängerte stationäre Wachstumsphase und die hohe Lyse-Unempfindlichkeit solcher Stämme sehr schön belegen. Zur Überprüfung dieser Annahme könnte eine Inaktivierung von *ciaR* und anschließende Phänotyp-Charakterisierung in einem klinischen Pneumokokken-Isolat wie 2349 vorgenommen werden.

Abschließend betrachtet suggerieren die in 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3 dargelegten Befunde, dass PBP2x-Mutationen – anders als bisher angenommen – die Funktionalität des Proteins und die Zellphysiologie wesentlich und weitreichend beeinflussen. Die Zelle „zahlt“ einen hohen Preis für die erworbene Resistenz: Sie wird zu einer Remodellierung der Zellwand-Struktur und des gesamten Metabolismus gezwungen und geht dabei ein nicht unerhebliches Risiko ein, was die „selbstvernichtende“ Lyse betrifft. Ein Verlust der „Fitness“ wurde auch für andere genetische Hintergründe und Antibiotika-Resistenzen in *S. pneumoniae* bestätigt (Barcus *et al.*, 1995; García-Bustos und Tomasz, 1990; Rozen *et al.*, 2007; Tomasz, 1994). Angesichts der Tatsache, dass PBP essentielle enzymatische Funktionen ausüben und nur in einer Kopie auf dem Chromosom vorliegen, ist es erstaunlich, dass das Bakterium es trotzdem schafft, die Folgen der β -Laktam-Resistenz zu kompensieren. Hierzu haben sich im Laufe der Evolution kompensatorische Mutationen bzw. Mechanismen herausgebildet; diese können entweder intra- oder intergenisch in Erscheinung treten (Andersson, 2003; Lenski, 1997; Levin *et al.*, 2000). Intragene kompensatorische Mutationen, welche die Proteinstabilität und -funktion aufrechterhalten, sind z. B. mit großer Sicherheit in den Mosaikblöcken von PBP2x klinischer Isolate angesiedelt; ein intergenisches kompensatorisches Regulationselement stellt dagegen das Cia-System oder der Stickstoffstoffwechsel in *S. pneumoniae* dar. Auch in einigen anderen Arbeiten konnte die Bedeutung solcher Mutationen bei der Resistenz und Virulenz in Pneumokokken aufgezeigt werden (Gillespie, 2001; Gillespie *et*

al., 2002; Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2006; Rieux *et al.*, 2001; Smith und Klugman, 2005; Soualhine *et al.*, 2005).

4.3 PBP2x und PBP1a

Während sich das Mosaik-*pbp1a* des klinischen Pneumokokken-Stammes 2349 in der PBP2x-Mosaik-Transformante R6_{*pbp2x2349*} ohne Probleme mit Cefotaxim selektionieren ließ, konnte eine Selektion in dem genetischen Hintergrund der PBP2x_{T338}-Punktmutanten nicht mit β -Laktamen realisiert werden. Die Bestimmung der MHK der R6_{*pbp2x2349pbp1a2349*}⁻ und mithilfe der Janus-Kassette hergestellten R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349*}⁻ Transformante lieferte die Erklärung für die Unterschiede in der Selektionierbarkeit: Die Kombination des Mosaik-PBP2x mit dem Mosaik-PBP1a führte wie erwartet zu einer hohen Resistenz gegenüber Cefotaxim; die Penicillin-Sensitivität blieb weitgehend unbeeinflusst. Bei Einführung des Mosaik-*pbp1a* in die T338G-Punktmutante kam es hingegen zu einem Abfall der Resistenz für beide β -Laktam-Gruppen. Da die Selektion mit Antibiotikakonzentrationen oberhalb der MHK erfolgte, konnten im ersten, nicht jedoch im zweiten Fall resistere Transformanten detektiert werden. Wie die erfolglose Selektion des 2349-*pbp1a* in der R6_{*pbp2xC606*}-Transformante, welche über ein PBP2x mit dem Resistenzpotential des PBP2x₂₃₄₉ verfügte, demonstrierte, lag dabei der Grund für den fehlenden Resistenzanstieg nicht in der Höhe der durch PBP2x vermittelten MHK, sondern vermutlich in seiner Modifizierung. Das bestätigte auch die Transformation einer M339F- bzw. T338A/M339F-PBP2x-Mutante mit einem anderen Mosaik-*pbp1a*, bei der ebenfalls keine Cefotaxim-resistenteren Transformanten generiert werden konnten (Chesnel *et al.*, 2003). Offensichtlich erfordert ein stark verändertes PBP1a für ein Eingreifen in das „Resistenzgeschehen“ die Präsenz eines stark veränderten PBP2x. Darüber hinaus müssen hierfür scheinbar auch die entsprechenden Mosaik-PBP aufeinander abgestimmt sein, d. h. aus dem gleichen klinischen Isolat stammen (Schähle, persönliche Mitteilung). Beides suggeriert die Existenz eines Selektionsdrucks, welcher für eine Anpassung der Aminosäuresequenz eines PBP-Proteins an seine zelluläre Umgebung sorgt, um so die Funktionalität des Zellteilungsapparates zu sichern. Brachte das PBP1a₂₃₄₉ auch keine Erhöhung der β -Laktam-Resistenz mit sich, so kompensierte es dennoch die durch die Abwesenheit eines funktionsfähigen CiaRH-Systems ausgelösten Wachstumsdefekte in der R6_{*pbp2xT338G*}-Mutante (siehe unten). Eine Inaktivierung von *pbp1a* hatte dagegen sowohl in R6_{*pbp2x2349*} als auch R6_{*pbp2xT338G*} eine Verschlechterung des Wachstums zur Folge, welche sich massiv verstärkte, wurde *ciaR* zusätzlich inaktiviert. Auch bei der Resistenz insbesondere der Cefotaxim-Resistenz war ein eindeutiger Einbruch zu verzeichnen, wenn *pbp1a* in den beiden Mutanten unterbrochen oder gar vollständig deletiert wurde. Das Vorhandensein eines intakten PBP1a, auch wenn es nicht in niederaffiner Form vorliegt, ist offenbar Voraussetzung für ein normales Wachstum und die Ausprägung von β -Laktam-Resistenz in

S. pneumoniae. In diesem Zusammenhang sind zwei Fakten von Bedeutung: Zum einen sind in Cefotaxim- und Piperacillin-resistenten Labormutanten trotz MHK-Werten von über 1 µg/ml keine Mutationen in PBP1a zu finden (Krauß und Hakenbeck, 1997; Laible und Hakenbeck, 1991; Laible *et al.*, 1989). Gleichsam konnten in *S. gordonii*-Mutanten mit einer bis zu 500fach erhöhten Penicillin-MHK keine Substitutionen in PBP1a, dem Homolog des Pneumokokken-PBP1a identifiziert werden. Zum anderen wurde in dieser Studie auch gezeigt, dass die Deletion von *pbp1a* und *pbp2a* die β-Laktam-Resistenz gerade in der Anfangsphase entscheidend drosselte, in bereits hochresistenten Mutanten aber nur noch moderat beeinflusste. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass Klasse A PBP durch ihre Transglykosylase-Aktivität den Weg für die Resistenz von Klasse B PBP ebnet (Haenni und Moreillon, 2006). Ähnliche Beobachtungen wurden bei *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* gemacht (Arbeloa *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2001). Dabei dürfte gerade die R6_{*pbp2x*T338G}-Mutante, welche sich in einer frühen Phase der Resistenzentwicklung befindet, auf PBP1a angewiesen sein. Beachtenswert ist auch die Feststellung, dass bei den bifunktionellen PBP1a und PBP1b von *E. coli* die Transglykosylierung auch ohne Transpeptidierung stattfindet, während letztere Funktion aber von ersterer abhängig ist und nur mit dieser gekoppelt ausgeführt werden kann (Born *et al.*, 2006; Terrak *et al.*, 1999).

Alle diese Befunde deuten auf eine Interaktion zwischen PBP2x und PBP1a hin. In zahlreichen Studien wurden Beweise für eine solche Wechselwirkung zwischen einem Klasse A und B PBP erhalten (Alaedini und Day, 1999; Pinho und Errington, 2005; Scheffers und Errington, 2004), für PBP3 und PBP1b von *E. coli*, den PBP2x- und PBP1b-Homologen von *S. pneumoniae* konnte sogar eine direkte Interaktion nachgewiesen werden (Bertsche *et al.*, 2006). PBP1b und PBP3 sind bei der Zellteilung am Septum lokalisiert (Weiss *et al.*, 1997), wo sie wahrscheinlich Teil eines Multienzymkomplexes aus Murein-Synthasen und -Hydrolasen sind (Höltje, 1996b, 1998). In *S. pneumoniae* sind PBP2x und PBP1a bei der Teilung ebenfalls in der äquatorialen Wachstumszone anzutreffen; und es wird angenommen, dass beide am septalen Zellwandwachstum (Zellteilung) beteiligt sind (Morlot *et al.*, 2003; Waxman und Strominger, 1983). Als Komplex, Transglykosylase- und Transpeptidase-Aktivität vereinernd, könnten sie sich so gegenseitig stabilisieren und funktionell komplementieren. Hierfür spricht auch die Flexibilität in der Lokalisation von Klasse A PBP in *S. pneumoniae*, welche je nach PBP-Ausstattung ihre Wanderung anpassen (Haenni *et al.*, 2006; Morlot *et al.*, 2003). Die bei der Zellwand-Analyse gewonnenen Resultate weisen möglicherweise ebenfalls auf eine solche Komplementierung hin (siehe 4.2.1.2). Darüber hinaus sind die Gene für PBP2x und PBP1a auf dem Pneumokokken-Chromosom in räumlicher Nähe zueinander angesiedelt und werden als Mosaik-Gene oft in einem einzigen Transformationsschritt übertragen (Gasc *et al.*, 1991; Muñoz *et al.*, 1992a). Vermutlich fungiert der N-terminale hydrophobe Membrananker von PBP3 als Interaktionsfläche für die Wechselwirkung mit PBP1b in *E. coli* (Bertsche *et al.*, 2006). Eine Reihe von Publikationen postulieren, dass dieser Teil für die Regulation der katalytischen Aktivität von PBP3,

Positionierung und Interaktion mit anderen Zellteilungsproteinen am Septum erforderlich ist (Eberhardt *et al.*, 2003; Fraipont *et al.*, 1994; Guzman *et al.*, 1997; Marrec-Fairley *et al.*, 2000; Piette *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 1999). Sollte tatsächlich auch in *S. pneumoniae* der Transmembranbereich von PBP2x und PBP1a für eine Interaktion benötigt werden, so könnte der Resistenzabfall in der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ -Transformante auf eine Beeinträchtigung dieser Wechselwirkung durch die Modifizierung des PBP1a₂₃₄₉ zurückzuführen sein.

Ein Vergleich der MHK-Werte von $R6_{pbp2x2349}$ mit denen der $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ -Transformante ergab, dass mit Cefotaxim eine Resistenzsteigerung einherging, die Empfindlichkeit für Penicilline (Penicillin G, Piperacillin und Oxacillin) jedoch unverändert bzw. noch erhöht war. Eine Cefotaxim-Resistenz muß nicht notwendigerweise mit einer Penicillin-Resistenz assoziiert sein, wenn ein unmodifiziertes PBP2b präsent ist, wie es bei $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ der Fall ist (Smith *et al.*, 2001). Während hohe Resistenz für Cefotaxim durch die alleinige Veränderung von PBP2x und PBP1a erreicht werden kann, verlangt die Entwicklung von hoher Penicillin-Resistenz das zusätzliche Vorliegen eines niederaffinen PBP2b (Barcus *et al.*, 1995; Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992a; Reichmann *et al.*, 1996; Smith und Klugman, 1998). Das liegt darin begründet, dass PBP2b zwar eine Affinität für Penicilline, aber keine für Cephalosporine der dritten Generation wie dem Cefotaxim besitzt, somit kein Target für letztere β -Laktam-Gruppe darstellt und folglich auch nicht an der Resistenz gegenüber diesen Antibiotika beteiligt ist (Hakenbeck *et al.*, 1987). Cephalosporine der dritten Generation rufen eine tolerante Antwort bei Pneumokokken hervor, d. h. es kommt zwar zu einer Hemmung des Wachstums der Bakterien, diese lysieren aber nicht wie unter der Behandlung mit anderen β -Laktamen. Zudem zeigen Pneumokokken-Stämme mit niederaffinen PBP2b-Varianten eine dramatisch reduzierte Lyse (Grebe und Hakenbeck, 1996; Liu und Tomasz, 1985; Reichmann *et al.*, 1997). Insofern ist davon auszugehen, dass eine Inhibition von PBP2b Voraussetzung für die β -Laktam-induzierte Lyse ist (Hakenbeck *et al.*, 1987). Ein solcher Zusammenhang äußerte sich auch im Transkriptomprofil und Lyseverhalten von $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$. Die Gene des Kompetenz-Regulons darunter *lytA* wurden in dieser Transformante im Vergleich zu $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ vermehrt exprimiert und $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ ließ eine ausgeprägtere Lyse bei einer *ciaR*-Inaktivierung erkennen als $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$. Die $R6_{pbp2x2349}$ -Transformante schien bei Anwesenheit des PBP1a₂₃₄₉ in höherem Maße an CiaRH gebunden zu sein als $R6_{pbp2xT338G}$. Demnach verhielten sich die PBP2x/PBP1a-Derivate bezüglich der Lyse und CiaRH also genau umgekehrt wie die PBP2x-Derivate.

Was die Kompetenz betraf, so wurde eine eindeutige Einflussnahme auf den Kompetenzablauf durch PBP1a festgestellt. Einen direkten Hinweis hierauf gab die Untersuchung des Kompetenzpeakverhaltens der $R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}$ - und $R6_{pbp2x2349pbp1a2349}$ -Transformante, bei der das PBP1a₂₃₄₉ jeweils eine signifikante Reduktion der Transformationseffizienz bewirkte. Ein in-

direktes Anzeichen trat bei der Gegenüberstellung des Lyseprofils der R6_{pbp2xT338GciaR::aad9comAB::aphIII}- und R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9}-Mutante zutage. Im Gegensatz zu einer Inaktivierung von *comAB* und damit Ausschaltung der Kompetenz konnte das PBP1a₂₃₄₉ die durch ein nichtfunktionelles CiaRH-System herbeigeführte Lyse in der R6_{pbp2xT338G} fast vollständig aufheben. Das läßt vermuten, dass das Mosaik-PBP1a durch eine Kompensierung der durch das PBP2x_{T338G} verursachten Zellwandschäden die Kompetenz und damit die Kompetenzlyse unterdrückt. Wie aus der Bestimmung der Transformationseffizienz für andere PBP bzw. PBP-Konstellationen hervorgeht, üben PBP generell einen Einfluss auf die Kompetenz aus (Schähle, 2005; Zerfaß, 2005). Es ist einleuchtend, dass sich auch die in einigen C- und P-Mutanten-Familien auftretende verringerte PBP2x- und PBP1a-Menge bzw. frühzeitige Termination und damit Nicht-Expression von *pbp2a* auf die Kompetenz auswirkt. Das unterschiedliche Lyseverhalten von *pbp1a*-, *pbp1b*- und *pbp2a*-Inaktivierungsmutanten bei einer Unterbrechung von *ciaR* (Heintz, 2006) legt diesen Schluss nahe.

4.4 PBP2x, CiaRH und ComDE – eine Zusammenfassung

Die in 4.2 und 4.3 diskutierten Resultate deuten stark auf ein direktes Zusammenspiel von PBP2x, CiaRH und ComDE bei der Entwicklung von β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* hin. Einen direkten Beweis hierfür lieferte die Cefotaxim-Resistenz der *ciaRcomAB*-Inaktivierungsderivate von C303, bei denen eine Inaktivierung von *ciaR* sowohl einen vollständigen Verlust der CiaH- als auch teilweisen der PBP2x-bedingten Resistenz zur Folge hatte; eine Unterbrechung von *comAB* hingegen aber ausschließlich ersteres bewirkte. Dass die Expression eines intakten CiaR-Proteins Voraussetzung für die Ausbildung der Cia-Cefotaxim-Resistenz ist, wurde bereits beschrieben (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 1996; Zähler *et al.*, 2002). Dass aber offensichtlich auch ein funktioneller ComAB-Transporter benötigt wird, ist neu und läßt vermuten, dass CiaRH die Resistenz über den CSP-Exporter ComAB, also die Kompetenz, vermittelt. In den C-Mutanten-Reihen geht eine Cia-abhängige Resistenzhöhung immer mit einer Kompetenzerniedrigung einher; ein Fehlen von CiaR hingegen bewirkt eine Resistenzerniedrigung und Kompetenzerhöhung. PBP2x wiederum ist auf ein intaktes CiaRH-System zur Resistenzausprägung angewiesen und reguliert mit diesem zusammen die Kompetenz (siehe 4.2.3). Das alles offenbart ein komplexes Netzwerk, welches aus den drei Hauptakteuren PBP2x, CiaRH und ComDE gebildet wird und für das im Folgenden nun ein Modell vorgestellt werden soll.

Das Modell basiert auf der Annahme, dass eine Perzipitation von CSP durch ComDE die primäre Route der Kompetenz-Regulation darstellt (CSP-abhängiger Weg), PBP2x und CiaRH aber exogene Signale in den Ablauf integrieren und somit regulatorisch intervenieren (CSP-unabhängiger Weg) (Abb. 4.1). Liegt ein unverändertes oder Mosaik-PBP2x in der Zelle vor, so erfolgt die Induktion der Kompetenz wie gewöhnlich in der exponentiellen Wachstumsphase durch

eine kritische extrazelluläre CSP-Konzentration. Das Cia-System wird am Ende der kompetenten Phase aktiviert und hemmt die Kompetenz und Kompetenzlyse durch die in 4.2.3 genannten Mechanismen. Diese Aktivierung kann unter Berücksichtigung, dass *cia*-Gene Teil des Kompetenz-Regulons sind, auf transkriptioneller Ebene durch ComE geschehen, über CiaH und den normalen Signaltransduktionsweg oder über eine Phosphorylierung von CiaR durch ComD, also einen „cross-talk“ bzw. eine „cross-regulation“ zwischen ComDE und CiaRH. Signale für CiaH könnten dabei CSP selber (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004), Muropeptide (Guenzi *et al.*, 1994), Oligopeptide, TAs oder Membranbestandteile repräsentieren, welche über den Status der Zellhülle und Nährstoffverfügbarkeit und damit über die Phase des Wachstums bzw. der Kompetenz informieren (siehe 4.2.1.3 und 4.2.3).

Bei Anwesenheit eines PBP2x mit „schwerwiegenden“ Punktmutationen kommt es zu Modifikationen in der Zellwand- und Membran-Zusammensetzung sowie Ladungsverschiebungen an der Zelloberfläche, welche sich auf die Kompetenz auswirken. Zusätzlich dienen schwach quervernetzte Muropeptide als Signal für ComD. Die Folge ist letzten Endes eine Verschiebung des Kompetenzpeaks in Richtung niedriger Zelldichten (siehe 4.2.3). Dementsprechend wird CiaRH über die oben genannten Wege zu einem früheren Zeitpunkt im Wachstum induziert und greift auch früher Kompetenz-inhibierend ein. Ein Mosaik-PBP1a kann jedoch die Zellwand- und damit auch Kompetenzdefekte kompensieren, wodurch eine normale Abwicklung des „Kompetenzgeschäfts“ wieder gewährleistet ist.

Sind „harmlose“ PBP2x-Substitutionen präsent, so werden kompensatorische Maßnahmen wie eine Mobilisierung des Stickstoffstoffwechsels eingeleitet (siehe 4.2.1.3 und 4.2.3). Der daraus resultierende erhöhte Nukleotid- bzw. Peptid-Pool in der Zelle signalisiert eine ausreichende Energieversorgung und hält die Kompetenz auf einem niedrigen Niveau, sodass sich das Cia-System ähnlich wie bei dem Wildtyp- bzw. Mosaik-PBP2x erst zum gewohnten Zeitpunkt einschaltet.

Verfügt CiaH über Mutationen, so würde durch den damit verbundenen postulierten Verlust der Phosphatase-Aktivität von CiaH das System stärker aktiviert werden, was sich phänotypisch in einer Unterdrückung der Kompetenz äußert. Allerdings ist hierfür das Wildtyp-Allel völlig ausreichend, sodass davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen Zusatz-Mechanismus handelt, der in Verbindung mit anderen den vollständigen Verlust der Kompetenz mit sich bringt.

Das Vorhandensein weiterer RR, welche dem CSP-abhängigen und -unabhängigen Weg bzw. ComDE und CiaRH zwischengeschaltet sind, sowie einer Hierarchie bei Präsenz von PBP2x- bzw. CiaH-Mutationen ist nicht auszuschließen. So könnten z. B. über einen tertiären RR die durch CiaH perzipierten Signale direkt an ComDE weitergeleitet werden.

Ein ähnliches Modell für die Kontrolle der Kompetenz wurde für *S. mutans* beschrieben (Ahn *et al.*, 2006) und auch bei *S. pneumoniae* finden sich über die vorliegende Arbeit hinaus weitere Ansätze für die Existenz eines solchen regulatorischen Netzwerks (Piñas *et al.*, 2008).

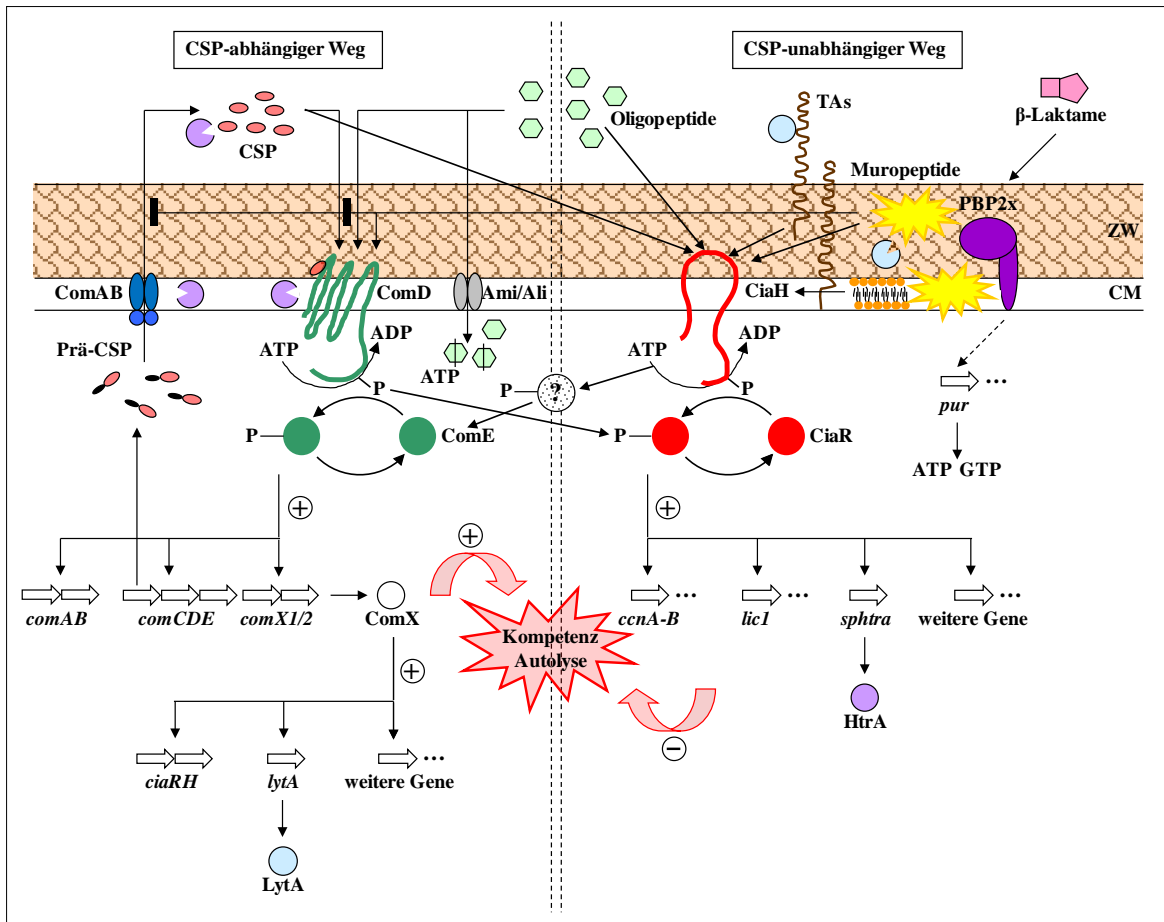


Abb. 4.1: Hypothetisches Modell zum Zusammenspiel von PBP2x, CiaRH und ComDE bei der Regulation der genetischen Kompetenz in *Streptococcus pneumoniae*.

Dargestellt ist eine Modellvorstellung zum Zusammenspiel von PBP2x, CiaRH und ComDE bei der Regulation der genetischen Kompetenz in *S. pneumoniae*. Die Signaltransduktionskaskade ist in zwei Routen unterteilt: einen CSP-abhängigen und einen CSP-unabhängigen Weg. Ersterer umfasst ComAB und ComDE und repräsentiert den Hauptweg zur Kompetenz-Regulation (siehe Abb. 1.6). Zweiterer integriert exogene Signale durch PBP2x und CiaRH in den Kompetenzablauf. Das Modell schließt einen „cross-talk“ zwischen ComDE und CiaRH sowie weitere zwischengeschaltete RR ein. Eine Hierarchie bei Anwesenheit von Mutationen in PBP2x bzw. CiaH wird ebenfalls angenommen. Dünne schwarze und dicke rote Pfeile deuten eine Interferenz an; ein + steht für eine positive, ein – für eine negative. Ein unterbrochener schwarzer Pfeil weist auf einen unbekannten Regulationsmechanismus hin. Schwarze Rechtecke symbolisieren eine Inhibition, gelbe Sterne Zellwand- bzw. Membranschäden. Detaillierte Erläuterungen siehe Text.

Abk.: CM (Cytoplasmamembran), ZW (Zellwand)

Aber wie kann nun der durch die Inaktivierung von *comAB* in C303 hervorgerufene Abfall der Cefotaxim-Resistenz mit diesem Modell erklärt werden? Die plausibelste Erklärung wäre, dass ComAB einen Stimulus für CiaH transportiert, welcher das Zwei-Komponenten-System in einen höheren Aktivierungszustand versetzt, was phänotypisch über CiaR und die entsprechenden Zielgene zur Cefotaxim-Resistenz führt. Sollte CSP das Signal sein, so könnte dies auch über ComDE realisiert werden (siehe oben). Ein fehlender ComAB-Transporter würde diese Aktivierung und damit die Resistenz unterbinden. Da aber mit dem Export von CSP zwangsläufig auch Kompetenz verbunden ist, stünde dies im Widerspruch mit der die Cefotaxim-Resistenz begleitenden Kompetenzdefizienz in den Labormutanten. Wird jedoch postuliert, dass der Angriffspunkt des

durch CSP aktivierten Cia-Systems erst nach ComAB in der Kompetenzkaskade folgt, kann diese Defizienz begründet werden. Dass möglicherweise generell Transporter für die Cia-vermittelte Cefotaxim-Resistenz eine Rolle spielen, zeigt die bei Einführung des CiaH-Stops in C401 massiv gesteigerte Expression des Gen-Clusters spr1545-1549, welche von einer starken Resistenz-Zunahme begleitet wird. Diese Gene codieren für putative Transportproteine und GTPasen und sind bereits in anderen C- und P-Labormutanten aufgefallen (Heintz, 2006; Volz, 2008), was auf eine mögliche Bedeutung für die β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae* hinweisen könnte. Auch hier wäre vorstellbar, dass diese Proteine ein Signal transportieren, welches CiaRH in einen aktivierten Zustand versetzt und dadurch den Resistenzphänotyp verursachen.

4.5 PBP2b von *Streptococcus pneumoniae* – oder der Versuch ein bis dato essentielles Protein zu deletieren

Mehrere Versuche zur Herstellung einer *pbp2b*-Inaktivierungs- und Deletionsmutante von *S. pneumoniae* R6 und des LytA-defizienten Pneumokokkenstammes M31 blieben erfolglos. Obwohl lebensfähige Transformanten mit einer Transformationseffizienz von bis zu $4,15 \times 10^{-3}$ % erhalten wurden, gelang es nicht, eine Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante zu isolieren. Auch wenn ein negatives Ergebnis kein endgültiger Beweis ist, kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass PBP2b ein für Pneumokokken essentielles Protein darstellt, was eine frühere Arbeit von Kell *et al.*, 1993 bestätigte. Im Vergleich zu anderen Inaktivierungsstudien, bei denen essentielle bzw. nicht-essentielle Proteine Transformanten mit einer Effizienz von 0 bis $< 10^{-7}$ % bzw. 10^{-5} bis 10^{-4} % lieferten (Kell *et al.*, 1993; Paik *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2005; Thanassi *et al.*, 2002), wurden in der vorliegenden Arbeit aber dennoch verhältnismäßig viele resistente Kolonien detektiert. Wie konnte dieser Sachverhalt erklärt werden? Die aus der PCR-Analyse mit den stromauf- und abwärts des transformierten Konstrukts gelegenen Primern hervorgegangene Kombination aus drei unterschiedlich stark vertretenen Rekombinationsereignissen (erfolgreiche, erfolglose *pbp2b*-Inaktivierung, Kombination aus beidem) ließ zunächst einmal darauf schließen, dass es sich hierbei um Mischpopulationen aus Klonen mit Wildtyp-, inaktiviertem *pbp2b*, und beidem handelte. Die Unterschiede in der Größe und dem zeitlichen Auftreten der Kolonien sowie ihr ineinander greifendes Wachstum deuteten ebenfalls darauf hin. Demzufolge hätten aber auch bei den PCR-Ansätzen mit den Primern innerhalb des transformierten Fragments bzw. deletierten *pbp2b*-Bereichs durchgehend Doppelbanden auftreten müssen, was nicht zutraf. Zudem war eine Vereinzelung der Klone anhand der Kolonienmorphologie nicht möglich, sodass diese Theorie ausgeschlossen werden kann. Wahrscheinlicher ist, dass durch ein bestimmtes Rekombinationsereignis oder eine Duplikation des transformierten Konstrukts alle Klone über eine Kombination aus Wildtyp- und inaktiviertem *pbp2b* verfügten, das Erscheinen der drei PCR-Hauptprodukte, sowie

einiger unspezifischer -Produkte demnach aus einer mehrfachen Hybridisierung der Primer innerhalb der Sequenz resultierte. Denkbar wäre auch, dass die Inaktivierung von *pbp2b* eine unvollständige Tochterzelltrennung, Chromosomen-Segregation oder -Replikation zur Folge hatte, was ebenfalls den beschriebenen PCR-Produkt-Phänotyp, aber auch die morphologischen Aberrationen bei dem Stamm M31 hervorrufen könnte. So wurde eine Verzögerung der Chromosomen-Trennung durch ein defektes PBP für PBP3 von *E. coli*, dem *S. pneumoniae* PBP2x-Äquivalent dokumentiert (Huls *et al.*, 1999). In *S. pneumoniae* ist *pbp2b* Teil des *dcw1* (division and cell wall cluster 1) (Abb. 4.2) (Massidda *et al.*, 1998), dessen Genprodukte an der DNA-Reparatur, Zellwandbiosynthese und Zellteilung beteiligt sind. Diese Gene sind in einem Cluster organisiert, damit ihre Produkte die Funktionen gemeinsam und koordiniert ausführen können. Eine durch willkürliche Rekombination, Tochterzell- oder Chromosomen-Trennung beeinträchtigte Expression eines der Gene könnte zu einer verringerten Protein-Menge führen und damit Protein-Protein-Interaktionen und die Funktionalität des gesamten Multienzymkomplexes empfindlich stören. Auf eine reduzierte Menge an Wildtyp-PBP2b in der Zelle weisen zwar die Differenzen in der Gel-Bandenintensität der einzelnen PCR-Produkte hin, nicht jedoch die SDS-PAGE, wobei von den M31-Transformanten leider keine Daten vorliegen.

Das Gen für PBP2b bzw. seinen Homologen kann in *S. gordonii* (Haenni *et al.*, 2006), *S. thermophilus* (Stingle und Mollet, 1996; Thibessard *et al.*, 2002), *B. subtilis* (*pbpA*, PBP2a) (Murray *et al.*, 1997) und *Staphylococcus aureus* (*pbpF*, PBP3) (Pinho *et al.*, 2000) inaktiviert werden; *S. pyogenes* besitzt kein funktionelles PBP2b, sondern lediglich ein rudimentäres Protein (SpyM3_1086). In *E. coli* ist das zu PBP2b homologe PBP2 (*mrdA*, vormals *pbpA*) essentiell (Ogura *et al.*, 1989). Die Analyse des Homologie-Grades dieser Proteine und der genetischen Organisation der für sie codierenden Gene ergab eine erstaunliche Übereinstimmung und Konservierung. Hierzu wurden die Nukleotidsequenzen von *S. gordonii* str. Challis substr. CH1, *S. thermophilus* CNRZ368, *S. pyogenes* MGAS315, *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, *Staphylococcus aureus* RF122 und *E. coli* K-12 substr. W3110, welche unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome> zur Verfügung standen, herangezogen, da fast alle dieser Stämme bzw. Derivate auch in den jeweiligen Inaktivierungsstudien zum Einsatz kamen. Mit der Anwendung „protein blast“ (blastp) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnte für das jeweilige Protein von *S. gordonii*, *S. thermophilus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *E. coli* eine 67, 48, 43, 33, 33 und 23 %ige Homologie (Identität) zu dem PBP2b von *S. pneumoniae* ermittelt werden. Darüber hinaus wurden weitere Vertreter der Gattung *Streptococcus* in die Untersuchungen miteinbezogen: *S. mitis* B6 (Hakenbeck, unveröffentlicht), *S. oralis* Uo5 (Hakenbeck, unveröffentlicht), *S. agalactiae* NEM316, *S. mutans* UA159 und *S. sanguinis* SK36. Hier konnte eine 49 bis 94 %ige Homologie festgestellt werden, was aber angesichts des hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrades, vor allem zwischen ersteren beiden und *S. pneumoniae* nicht weiter verwunderte (Bishop *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 1995; Kilian *et al.*, 2008).

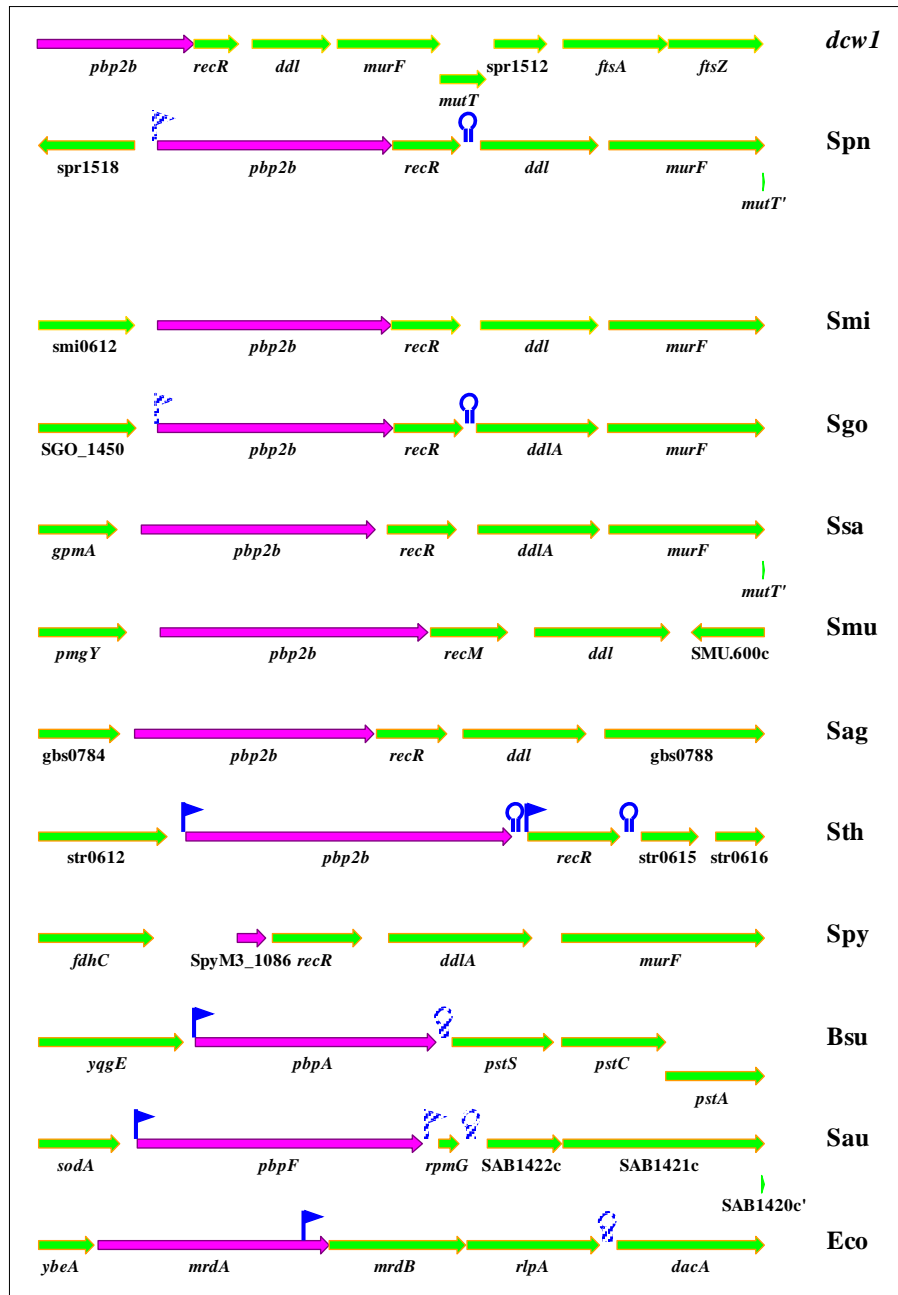


Abb. 4.2: Genetische Organisation von *pbp2b* und seinen Homologen in Streptokokken, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*.

Aufgezeigt ist die genetische Organisation von *pbp2b* und seinen Homologen in Streptokokken, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *E. coli* mit identifizierten Transkriptionssignalen. In *S. pneumoniae* ist *pbp2b* Teil des *dcw1* und befindet sich in einer Operonstruktur mit dem stromabwärts gelegenen *recR*. Gene sind durch dicke Pfeile dargestellt (pink: *pbp2b*; grün: flankierende Gene von *pbp2b*), wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Gene wiedergibt, experimentell bestätigte Promotoren und Terminatoren sind durch blaue, putative durch blau schraffierte Fahnen und Stem-Loop-Strukturen gekennzeichnet. Rechts neben der Anordnung befindet sich abgekürzt die jeweilige Bakterienart: Spn: *Streptococcus pneumoniae*; Smi: *Streptococcus mitis*; Sgo: *Streptococcus gordonii*; Ssa: *Streptococcus sanguinis*; Smu: *Streptococcus mutans*; Sag: *Streptococcus agalactiae*; Sth: *Streptococcus thermophilus*; Spy: *Streptococcus pyogenes*; Bsu: *Bacillus subtilis*; Sau: *Staphylococcus aureus*; Eco: *Escherichia coli*.

Was die genetische Organisation von *pbp2b* betraf, so ist diese, zumindest in den Streptokokken, stark konserviert (Abb. 4.2). In *S. pneumoniae* befindet sich *pbp2b* in einer Operonstruktur mit dem stromabwärts gelegenen *recR*. Am 3'-Ende von letzterem konnte eine Terminatorstruktur, am 5'-Ende von *pbp2b* ein putativer Promotor detektiert werden. Die beiden unmittelbar flankierenden Gene *spr1518* bzw. *recR* codieren für einen putativen Phosphatzucker-bindenden Transkriptionsregulator bzw. das Protein RecR, welches in einen *recBC*-Komplex-unabhängigen Rekombinationsprozess der DNA-Reparatur involviert ist. Stromabwärts folgen die Gene *ddl* und *murF*, deren Produkte beide an der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt sind und das für ein Mutatorprotein codierende *mutT*. Die Abfolge *pbp2b-recR-ddl-murF* findet sich auch in *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. agalactiae*, *S. mutans* und *S. sanguinis*; das am 5'-Ende gelegene Gen weist jedoch im Gegensatz zu *S. pneumoniae* immer die gleiche Transkriptionspolarität wie die nachstehenden Gene auf. Bei den Promotorsequenzen war ebenfalls eine Konservierung zu erkennen (Haenni *et al.*, 2007). Für *S. oralis* konnte aufgrund der noch unvollständigen Annotation keine Aussage getroffen werden. Bei *S. pyogenes* fehlt, wie bereits erwähnt, ein Gen für PBP2b; der stromabwärts gelegene Bereich stimmt aber mit dem der oben genannten Arten überein. *S. thermophilus* unterscheidet sich insofern, dass *pbp2b* und das zu *recR* homologe *recM* von jeweils einem eigenen Promotor aus als monocistronische mRNA transkribiert werden. In *B. subtilis*, *E. coli* und *Staphylococcus aureus* ist allerdings das entsprechende Gen nicht in einem *dcw*-Cluster lokalisiert und auch die genetische Anordnung gestaltet sich völlig anders als in den Streptokokken.

Vor diesem Hintergrund kam natürlich nun die Frage auf, warum gerade in Streptokokken solche Gegensätze hinsichtlich der Bedürftigkeit für PBP2b existieren. Ein Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen ökologischen Nischen der einzelnen Arten liegen. Durch den dort jeweils herrschenden Selektionsdruck wird eine ganz bestimmte genetische Ausstattung favorisiert (Anisimova *et al.*, 2007). Dabei haben die Funktionen einiger Proteine an Bedeutung verloren bzw. sind von anderen übernommen worden. Ein Beispiel für eine solche Redundanz eines Proteins repräsentiert vermutlich PBP2b bei *S. thermophilus* (Stingele und Mollet, 1996). Aber auch die verschiedenen Kokken-Formen spiegeln sich in der Abhängigkeit von einem PBP wider. Während *S. pneumoniae* eine ellipsoide Kokken-Form zeigt, zu der PBP2b beiträgt, ist *S. pyogenes* ohne PBP2b eher sphärisch geformt (Zapun *et al.*, 2008). Hierfür spricht auch die im Vergleich zum Parentalstamm stärkere sphärische Gestalt von *pbp2b*-Inaktivierungsmutanten bei *S. thermophilus* (Stingele und Mollet, 1996; Thibessard *et al.*, 2002). Die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei der Ausbildung der β -Laktam-Resistenz kennzeichnen ebenfalls die Notwendigkeit eines PBP. Es ist einsehbar, dass im Zuge der Resistenzentstehung zunächst dasjenige Target verändert wird, welches eine essentielle Aufgabe in der Zelle erfüllt, da dessen Inhibition durch Antibiotika letale Folgen haben kann (Hakenbeck *et al.*, 1993). Dass in *S. pneumoniae* zuerst PBP wie PBP2b modifiziert werden, bevor Nicht-PBP eine Veränderung erfahren (Grebe und Hakenbeck, 1996; Hakenbeck *et al.*, 1999), in *S. gordonii* hingegen genau der umgekehrte Weg bestritten wird

(Haenni und Moreillon, 2006), suggeriert die Unentbehrlichkeit bzw. Entbehrlichkeit von PBP2b in erstem bzw. zweitem Organismus. Penicillin-resistente *S. pyogenes*-Isolate wurden trotz mehr als 50 Jahre Antibiotika-Therapie niemals detektiert (de Melo *et al.*, 2003; Perez-Trallero *et al.*, 2001) und auch die Selektion von Resistenz im Labor erweist sich als sehr schwierig, Tatsachen, welche auf der Abwesenheit von PBP2b in diesem Bakterium beruhen könnten (Haenni *et al.*, 2007). In *S. pneumoniae* scheint PBP2b mit dem Lysephänotyp assoziiert zu sein, was seine Bedeutung als letales Target unterstreicht (Hakenbeck *et al.*, 1987). Durch die Hinzunahme der *lytA*-Deletionsmutante M31 als Rezipienten für das *pbp2b*-Inaktivierungs- bzw. Deletionskonstrukt sollte verhindert werden, dass potentielle Transformanten aufgrund des fehlenden PBP2b lysierten und nicht mehr sichtbar waren. Überraschenderweise war mit M31 die Ausbeute an Transformanten wesentlich größer als mit R6, konnten nur hier Deletionstransformanten und morphologisch beeinträchtigte Zellen generiert werden, wobei letztere vielleicht auch einfach nur aufgrund der Kettenbildung des Ausgangsstammes leichter zu detektieren waren. Sollte etwa mit der Ausschaltung der LytA-bedingten Lyse bereits ein Ansatz in Richtung *pbp2b*-Inaktivierung gemacht worden sein? Interessanterweise gibt es Hinweise auf eine mögliche Interaktion der N-terminalen Domäne von PBP2b mit LytA (Scheller, 2005). Es wäre durchaus vorstellbar, dass PBP2b während des exponentiellen Wachstums die lytische Aktivität dieses Enzyms kontrolliert. Allerdings muß auch eingeräumt werden, dass M31 keinen idealen Rezipienten vertritt, da dieser Stamm durch eine generelle Mutagenese mit Nitrosoguanidin hergestellt wurde (Sánchez-Puelles *et al.*, 1986) und die Deletion nicht nur *lytA*, sondern auch flankierende Bereiche umfasst (Tomasz *et al.*, 1988). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Phänotypen von den benachbarten Genen ausgehen.

Abschließend muß festgehalten werden, dass auch wenn PBP2b für *S. gordonii*, *S. thermophilus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus* nicht essentiell ist, die Abwesenheit des Proteins jeweils dramatische Auswirkungen auf die Zellphysiologie hatte, welche sich in morphologischen Aberrationen (*Staphylococcus aureus* bei Präsenz von subinhibitorischen Methicillin-Konzentrationen), Wachstumsdefekten (*S. gordonii*, *S. thermophilus*), verstärkter Penicillin-induzierter Lyse (*S. gordonii*), Verlust der Exopolysaccharid-Produktion, erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (*S. thermophilus*) und verzögerter Sporenkeimung (*B. subtilis*) äußerten.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Mutationen in PBP2x nicht nur den „Gewinn“ Resistenz mit sich bringen, sondern auch weitreichende und zum Teil schwerwiegende Folgen für die Zellphysiologie haben. So konnte mit der modifizierten Zellwand der PBP2x_{C303}-Mutanten

erstmal eine direkte Auswirkung der PBP2x-vermittelten β -Laktam-Resistenz ausgemacht werden. Wie in Abwesenheit eines funktionellen Zwei-Komponenten-Systems CiaRH sichtbar wurde, haben verschiedene *pbp2x*-Allele unterschiedlich starke Auswirkungen auf das Wachstum, die Zellmorphologie und -vitalität. Die Analyse der Zellwand weiterer PBP2x-Punkt- aber auch Mosaikmutanten kann klären, ob sich diese Differenzen auch in der Zellwand-Zusammensetzung widerspiegeln. Von Interesse wäre ebenfalls eine mengenmäßige Bestimmung des TA- bzw. Uridindiphosphat (UDP) -Vorläufer-Pools in der Zelle, um auch hier mögliche Defizite aufzudecken.

Die Präsenz des Mosaik-PBP1a von *S. pneumoniae* 2349 in dem genetischen Hintergrund der T338G-Mutation bewirkte zwar keinen weiteren Resistenzanstieg, kompensierte aber dennoch die durch das fehlende Cia-System verursachten Wachstumsdefekte. In diesem Zusammenhang könnte eine Gegenüberstellung der Zellwand-Struktur der Mutanten R6_{*pbp2xT338G*} und R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349*} bzw. R6_{*pbp2xT338GciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9*} Hinweise auf kompensatorische Mechanismen und auf das (die) von CiaRH detektierte(n) Signal(e) liefern. Viele Befunde dieser Arbeit deuten auf eine Interaktion zwischen PBP2x und PBP1a hin. *In vitro*- und *in vivo*-Interaktionsstudien (Affinitätschromatographie, Oberflächen-Plasmon-Resonanz, bakterielles two-hybrid-System, cross-linking, Coimmunopräzipitation) mit diesen PBP unter Hinzunahme weiterer Zellteilungsproteine und β -Laktame wie Cefotaxim könnten helfen eine solche Wechselwirkung nachzuweisen. Da vermutlich der N-terminale hydrophobe Transmembranbereich hierfür benötigt wird, sollten die vollständigen Proteine aufgereinigt und in den Studien eingesetzt werden.

Der Lysephänotyp der R6_{*pbp2xT338Gpbp1a2349ciaR::aad9*}-Mutante im Vergleich mit dem der PBP2x-Mutanten bei einer gemeinsamen Inaktivierung von *comAB* und *ciaR*, sowie das Kompetenzpeakverhalten und die Transkriptomanalyse ausgewählter PBP2x/PBP1a-Mutanten suggerierten eine Cia-entkoppelte Beeinflussung der Kompetenz durch PBP. Durch eine Unterbrechung von ComE in den *ciaRcomAB*-Inaktivierungsmutanten mit PBP2x-Substitutionen müsste überprüft werden, ob die dort beobachtete „Restlyse“ immer noch von der Kompetenz herrührt oder vielleicht auf Modifikationen in der Zellwand zurückzuführen ist. Eine über die Wachstumskurve verfolgte Genexpression von *lytA* würde zudem Aufschluss darüber geben, ob die erhöhte Lyse-Empfindlichkeit womöglich auf einer veränderten *lytA*-Expression beruht. Mit einer Untersuchung des Kompetenzpeakverhaltens von *ciaR*-Inaktivierungsderivaten mit verschiedenen PBP-Konstellationen könnte schließlich der endgültige Beweis für eine Cia-unabhängige Regulation der Kompetenz durch PBP erbracht werden.

Der Resistenzphänotyp der *ciaR::aad9comAB::aphIII*-Derivate von C303 wies auf eine direkte Vernetzung von PBP2x, CiaRH und ComDE, sowie einen „cross-talk“ zwischen letzteren beiden hin. Dabei fungieren CSP oder Muropeptide möglicherweise als Signalmoleküle. *In vitro*-Phosphorylierungsassays und Proteininteraktionsstudien mit der extracytoplasmatischen Domäne von CiaH stellen einen Einstieg für detaillierte Folgeexperimente in dieser Richtung dar. Um Aus-

sagen über Unterschiede in der Aktivierbarkeit des Cia-Systems treffen zu können, wäre darüber hinaus eine umfassende phänotypische und transkriptionelle Charakterisierung verschiedener Kombinationen aus *pbp2x*- und *ciaH*-Allelen wünschenswert. Auch ein Vergleich der Transkription des Cia-Regulons in PBP2x-Mutanten und dem Wildtyp über das gesamte Wachstum ist dringend erforderlich. Weiterhin wäre interessant festzustellen, inwiefern klinische Isolate wie 2349 auf ein intaktes CiaRH-System angewiesen sind.

Aus der Microarray-basierten globalen Transkriptomanalyse spontanresistenter Labormutanten mit PBP2x- und CiaH-Austauschen gingen einige Resistenz-relevante bzw. -assistierende Gene wie die Gen-Cluster spr1545-1549 und spr0096-spr0110 und die Gene des Purinmetabolismus hervor, welche die Basis für weiterführende Untersuchungen bilden. Einer detaillierten Analyse bedarf auch die Vielzahl an als signifikant in Erscheinung getretenen intergenen Bereiche.

Was die Inaktivierung bzw. Deletion des Gens für das PBP2b von *S. pneumoniae* betrifft, so wurden zwar lebensfähige Transformanten erhalten, eine „reine“ Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante befand sich allerdings nicht darunter, sondern ausschließlich Mischpopulationen aus drei Rekombinationsereignissen. Durch Western-Blotting müßte abschließend klargestellt werden, dass insbesondere in den M31-Transformanten tatsächlich keine verringerte PBP2b-Menge vorliegt. Eine Untersuchung des Effekts einer reduzierten *pbp2b*-Expression auf die Zellphysiologie mithilfe eines Integrationsvektors für induzierbare Transkriptionsfusionen (Oberhettinger, 2007) könnte zum Verständnis der Rolle von PBP2b bei der Autolyse und Zellteilung beitragen.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung von β -Laktam-Resistenz in dem Pathogen *S. pneumoniae* stellt einen komplexen Prozess dar, welcher auf einer Modifikation der PBP, der Targetstrukturen von β -Laktam-Antibiotika beruht. PBP sind Membran-gebundene Enzyme, welche essentielle Reaktionen bei der bakteriellen Zellwand-Synthese katalysieren. Diese Proteine werden im Zuge der Resistenzentstehung so verändert, dass β -Laktame nicht mehr oder nur noch mit geringer Affinität gebunden werden, das physiologische Substrat aber noch erkannt werden muß.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem PBP2x von *S. pneumoniae*, das als essentielles PBP und wichtigste primäre Resistenzdeterminante einen hohen Stellenwert bei der Entstehung von β -Laktam-Resistenz in diesem Organismus einnimmt. Obwohl dieses PBP zu den am besten untersuchten PBP gehört, bleiben die Resistenzrelevanz einzelner Punktmutationen und die mit der Veränderung des Proteins einhergehenden physiologischen Folgen für die Zelle weitgehend unklar. Zentraler Inhalt dieser Arbeit war die Untersuchung des Effekts von PBP2x-Mutationen auf die Resistenz, Funktionalität von PBP2x und Zellphysiologie im Kontext mit der sekundären Resistenzdeterminante PBP1a und den beiden Zwei-Komponenten-Systemen CiaRH, welches in die Cefotaxim-Resistenz, genetische Kompetenz und Virulenz involviert ist und ComDE, das die genetische Kompetenz reguliert.

Besonderes Interesse galt dabei der Position Thr338, welche sich unmittelbar benachbart zum aktiven Serin befindet und in den meisten resistenten klinischen Isolaten zu Alanin, Prolin oder Glycin mutiert ist (Asahi *et al.*, 1999; Bergmann, 2003; Bicmen *et al.*, 2006; Carapito *et al.*, 2006a; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; du Plessis *et al.*, 2002; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002; Sanbongi *et al.*, 2004; Schmitt, 2004; Smith und Klugman, 2005). Durch eine gerichtete Mutagenese dieser Position im Wildtyp R6 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Thr338-Punktmutation einen selektionierbaren Resistenzphänotyp *in vivo* vermittelt, wobei abhängig von dem jeweiligen Austausch unterschiedliche Resistenzniveaus und Kreuz-resistenzspektren zu beobachten waren. Abgesehen von einem nur moderaten Beitrag zur Resistenz, betraf eine solche Substitution offenbar auch die Funktionalität von PBP2x, was sich auf dramatische Art und Weise in Abwesenheit eines intakten CiaRH-Regulationssystems äußerte: Es kam zu Wachstumsdefekten, insbesondere einer verfrühten und verstärkten Autolyse, morphologischen Aberrationen und einer verminderten Lebensfähigkeit. Entgegen aller Erwartungen führte die Präsenz eines Mosaik-PBP1a in dem genetischen Hintergrund der Thr338-Mutation nicht zu einem weiteren Anstieg der Resistenz, sondern bewirkte sogar einen leichten Abfall. Dennoch komplementierte das Mosaik-PBP1a die durch das Fehlen eines funktionsfähigen CiaRH-Systems hervorgerufenen Wachstumsdefizienzen. Der Vergleich zwischen dem PBP2x mit Thr338-Punktmutation und einem Mosaik-PBP2x deckte gravierende Unterschiede im Hinblick auf das Resistenzpotential und die physiologischen Auswirkungen auf. Anders als bei der PBP2x-Punktmutation waren bei dem Mosaik-PBP2x fast keine Wachstumseinbußen zu verzeichnen, wenn es mit einem inaktiven Zwei-Komponenten-System CiaRH kombiniert wurde, und die An-

wesenheit eines Mosaik-PBP1a brachte eine starke Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz mit sich. Beiden *pbp2x*-Allelen war jedoch gemeinsam, dass die Abwesenheit eines PBP1a massive Defekte im Wachstum zur Folge hatte. Alle diese Beobachtungen deuteten auf eine mögliche Interaktion zwischen PBP2x und PBP1a hin.

Die Analyse der Zellwand einer Mutante mit zwei PBP2x-Aminosäureaustauschen, von denen einer in resistenten klinischen Stämmen anzutreffen ist, ergab eine biochemisch modifizierte Zellwand, in der bei einem fast gleichbleibenden Anteil an verzweigten Dimeren, Monomere erhöht, und lineare Dimere und Trimere reduziert waren. Diese Befunde ließen auf eine enzymatische Beeinträchtigung dieses PBP2x schließen. Ein von CiaRH ausgehender Effekt konnte nicht festgestellt werden.

Eine Inaktivierung des für den Export des Kompetenz-stimulierenden Peptids CSP verantwortlichen ABC-Transporters ComAB in Kombination mit einem nicht-funktionellen CiaRH-System bewirkte im Wildtyp eine vollständige, in PBP2x-Punktmutanten eine nur teilweise Aufhebung der vorzeitigen stationären Phase-Autolyse. Darüber hinaus machte sich bei einem der PBP2x-Derivate, welches zusätzlich über eine Cefotaxim-Resistenz-vermittelnde Aminosäuresubstitution in CiaH verfügte, bei *ciaR*-Inaktivierung sowohl ein Verlust der CiaH- als auch eine partielle Einbuße der PBP2x-Resistenz bemerkbar, bei *comAB*-Inaktivierung hingegen aber ausschließlich ersteres. Hieraus konnte zum einen auf einen direkten Bezug des Lyse-Phänotyps zu der Kompetenz und der CiaRH-Resistenz zu ComAB geschlossen werden, zum anderen auf einen CiaRH-unabhängigen Einfluss von PBP2x auf die Kompetenz und Autolyse. Tatsächlich bestätigte eine Bestimmung der Transformationseffizienz von Mutanten mit verschiedenen Konstellationen aus niederaffinen und unmodifizierten PBP, dass das Kompetenzmuster bzw. -ausmaß von der jeweiligen PBP-Ausstattung moduliert wird.

Auch eine Microarray-basierte globale Transkriptomanalyse dieser Mutanten sowie spontan resistenter Labormutanten mit PBP2x- und CiaH-Mutationen suggerierte eine von CiaRH-entkoppelte Einflussnahme der PBP auf die Kompetenz. Zudem zeugten die Transkriptionsmuster von einem vielschichtigen Regulationsnetzwerk der Resistenzentwicklung unter Beteiligung von Kompetenz, Bakteriocinproduktion, Virulenz, Metabolismus, Transportprozessen und Energiestatus, was möglicherweise eine indirekte Folge einer gestörten Zellwand- und Membranintegrität darstellt. Durch die Extraktion von intergenen Bereichen, sowie potentiellen neuen Resistenzdeterminanten bzw. Resistenz-unterstützenden Genen, wie den Gen-Clustern *spr1545-spr1549* und *spr0096-spr0110* oder den Genen des Purinstoffwechsels wurde die Basis für weiterführende Untersuchungen geschaffen.

Die hier vorgestellten Daten demonstrieren, dass der Erwerb von β -Laktam-Resistenz nicht nur von Vorteil ist, sondern auch physiologische Konsequenzen für die Zelle hat, die sie kompensiert, um ein möglichst stabiles Wachstum zu gewährleisten. Über die Zellwand-Zusammensetzung und Kompetenz konnte erstmalig eine Verbindung von PBP2x zu CiaRH hergestellt werden. Eine

konkrete kompensatorische Wirkung dieses Regulons hinsichtlich PBP2x-Mutationen wurde mit der Repression der Kompetenzlyse ausfindig gemacht.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde basierend auf einer Veröffentlichung von Kell *et al.*, 1993, in der eine Inaktivierung des Gens für das PBP2b von *S. pneumoniae* erfolglos blieb, erneut versucht, eine solche Mutante herzustellen. Obwohl lebensfähige Transformanten generiert werden konnten, war es nicht möglich eine *pbp2b*-Inaktivierungs- bzw. Deletionsmutante zu isolieren, sodass PBP2b in diesem Organismus weiterhin als essentielles Protein angesehen werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Abachin E., Poyart C., Pellegrini E., Milohanic E., Fiedler F., Berche P. und Trieu-Cuot P.** (2002): Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**(1): 1-14.
- Ahn S. J., Wen Z. T. und Burne R. A.** (2006): Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infect Immun* **74**(3): 1631-1642.
- Alaedini A. und Day R. A.** (1999): Identification of two penicillin-binding multienzyme complexes in *Haemophilus influenzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(1): 191-195.
- Alloing G., de Philip P. und Claverys J. P.** (1994): Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **241**(1): 44-58.
- Alloing G., Granadel C., Morrison D. A. und Claverys J. P.** (1996): Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **21**(3): 471-478.
- Alloing G., Martin B., Granadel C. und Claverys J. P.** (1998): Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol* **29**(1): 75-83.
- Alloing G., Trombe M. C. und Claverys J. P.** (1990): The *ami* locus of the gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **4**(4): 633-644.
- Andersson D. I.** (2003): Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**(5): 452-456.
- Anisimova M., Bielawski J., Dunn K. und Yang Z.** (2007): Phylogenomic analysis of natural selection pressure in *Streptococcus* genomes. *BMC Evol Biol* **7**: 154.
- Appelbaum P. C.** (1987): World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol* **6**(4): 367-377.
- Appelbaum P. C.** (2002): Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clin Infect Dis* **34**(12): 1613-1620.
- Arbeloa A., Segal H., Hugonnet J. E., Josseaume N., Dubost L., Brouard J. P., Gutmann L., Mengin-Lecreux D. und Arthur M.** (2004): Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **186**(5): 1221-1228.
- Archibald A. R.** (1988): Bacterial cell wall structure and the ionic environment. In Homeostatic mechanisms in microorganisms. Whittenbury, R., Gould, G. W., Banks, J. G. und Board, R. G. (Hrsg.). Bath University Press, Bath, United Kingdom. 159-173.
- Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E. G., Margalit H. und Altuvia S.** (2001): Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**(12): 941-950.
- Asahi Y., Takeuchi Y. und Ubukata K.** (1999): Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1252-1255.
- Asahi Y. und Ubukata K.** (1998): Association of a Thr371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(9): 2267-2273.
- Avery O. T., Macleod C. M. und 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**(2): 137-158.
- Barcus V. A., Ghanekar K., Yeo M., Coffey T. J. und Dowson C. G.** (1995): Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **126**(3): 299-303.

- Barreteau H., Kovac A., Boniface A., Sova M., Gobec S. und Blanot D.** (2008): Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 168-207.
- Bartilson M., Marra A., Christine J., Asundi J. S., Schneider W. P. und Hromockyj A. E.** (2001): Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol Microbiol* **39**(1): 126-135.
- Bättig P. und Mühlemann K.** (2008): Influence of the *spxB* gene on competence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **190**(4): 1184-1189.
- Becker P.** (2008): Genetische Determinanten für die Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* gegen das neue Antibiotikum Vancoresmycin. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Behr T., Fischer W., Peter-Katalinic J. und Egge H.** (1992): The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur J Biochem* **207**(3): 1063-1075.
- Benjamini Y. und Hochberg Y.** (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* **57**: 289-300.
- Benjamini Y. und Yekutieli D.** (2001): The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat* **29**(4): 1165-1188.
- Bensing B. A., Meyer B. J. und 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 U S A* **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. und Spratt B. G.** (2006): Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**(3): e31.
- Bergey D. H., Buchanan R. E., Gibbons N. E. und ASM** (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bergmann C.** (2003): Epidemiologie eines Mosaikgens: *pbp2x* in β -Laktam-sensitiven und -resistenten oralen Streptokokken aus Spanien. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Berry A. M. und Paton J. C.** (1996): Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **64**(12): 5255-5262.
- Bertani G.** (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**(3): 293-300.
- Bertsche U., Kast T., Wolf B., Fraipont C., Aarsman M. E., Kannenberg K., von Rechenberg M., Nguyen-Disteche M., den Blaauwen T., Höltje J. V. und Vollmer W.** (2006): Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**(3): 675-690.
- Bethe G., Nau R., Wellmer A., Hakenbeck R., Reinert R. R., Heinz H. P. und Zysk G.** (2001): The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **205**(1): 99-104.
- Betzner A. S., Ferreira L. C., Höltje J. V. und Keck W.** (1990): Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **55**(1-2): 161-164.
- Bicmen M., Gulay Z., Ramaswamy S. V., Musher D. M. und Gur D.** (2006): Analysis of mutations in the PBP-genes of penicillin-non-susceptible pneumococci from Turkey. *Clin Microbiol Infect* **12**(2): 150-155.
- Bishop C. J., Aanensen D. M., Jordan G. E., Kilian M., Hanage W. P. und Spratt B. G.** (2009): Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol* **7**: 3.

- Bittner M., Kupferer P. und Morris C. F.** (1980): Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal Biochem* **102**(2): 459-471.
- Blake M. S., Johnston K. H., Russell-Jones G. J. und Gotschlich E. C.** (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**(1): 175-179.
- Bolivar F., Betlach M. C., Heyneker H. L., Shine J., Rodríguez R. L. und Boyer H. W.** (1977): Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5265-5269.
- Born P., Breukink E. und Vollmer W.** (2006): *In vitro* synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**(37): 26985-26993.
- Bouhss A., Trunkfield A. E., Bugg T. D. und Mengin-Lecreulx D.** (2008): The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 208-233.
- Bourret R. B.** (2006): Census of prokaryotic senses. *J Bacteriol* **188**(12): 4165-4168.
- Bowers E. F. und Jeffries L. R.** (1955): Optochin in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol* **8**(1): 58-60.
- Boyd D. A., Cvitkovitch D. G., Bleiweis A. S., Kiriukhin M. Y., Debabov D. V., Neuhaus F. C. und Hamilton I. R.** (2000): Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol* **182**(21): 6055-6065.
- Briese T. und Hakenbeck R.** (1983): Interaction between choline and the N-acetyl-muramyl-L-alanine-amidase of *Streptococcus pneumoniae*. In The target of penicillin. Hakenbeck, R., Höltje, J.-V. und Labischinski, H. (Hrsg.). Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany. 173-178.
- Briese T. und Hakenbeck R.** (1985): Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem* **146**(2): 417-427.
- Brown J. H.** (1919): The use of blood agar for the study of streptococci. *Monograph No.9*.
- Brückner R., Nuhn M., Reichmann P., Weber B. und Hakenbeck R.** (2004): Mosaic genes and mosaic chromosomes-genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* **294**(2-3): 157-168.
- Brundish D. E., Shaw N. und Baddiley J.** (1965a): The glycolipids from the non-capsulated strain of pneumococcus I-192R, A.T.C.C. 12213. *Biochem J* **97**(1): 158-165.
- Brundish D. E., Shaw N. und Baddiley J.** (1965b): The glycolipids from a rough strain of pneumococcus type I. *Biochem Biophys Res Commun* **18**: 308-311.
- Burnette W. N.** (1981): „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
- Caldon C. E. und March P. E.** (2003): Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr Opin Microbiol* **6**(2): 135-139.
- Caldon C. E., Yoong P. und March P. E.** (2001): Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol Microbiol* **41**(2): 289-297.
- Campbell E. A., Choi S. Y. und Masure H. R.** (1998): A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol* **27**(5): 929-939.
- Carapito R., Chesnel L., Vernet T. und Zapun A.** (2006a): Pneumococcal β -lactam-resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. *J Biol Chem* **281**(3): 1771-1777.
- Carapito R., Gallet B., Zapun A. und Vernet T.** (2006b): Automated high-throughput process for site-directed mutagenesis, production, purification, and kinetic characterization of enzymes. *Anal Biochem* **355**(1): 110-116.

- Chai Y., Chu F., Kolter R. und Losick R.** (2008): Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**(2): 254-263.
- Chalkley L., Schuster C., Potgieter E. und Hakenbeck R.** (1991): Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **69**(1): 35-42.
- Chastanet A., Prudhomme M., Claverys J. P. und Msadek T.** (2001): Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* **183**(24): 7295-7307.
- Chen J. D. und Morrison D. A.** (1987): Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**(7): 1959-1967.
- Chesnel L., Pernot L., Lemaire D., Champelovier D., Croize J., Dideberg O., Vernet T. und Zapun A.** (2003): The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to β -lactams of resistant strains. *J Biol Chem* **278**(45): 44448-44456.
- Chi F.** (2004): The role of viridans streptococci in the evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Genetic relationships, mosaic *pbp1a* genes and the price of resistance. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M. und 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.
- Clark R. A.** (1986): Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils. *J Immunol* **136**(12): 4617-4622.
- Claverys J. P., Grossiord B. und Alloing G.** (2000): Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Res Microbiol* **151**(6): 457-463.
- Claverys J. P. und Håvarstein L. S.** (2002): Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**: d1798-1814.
- Claverys J. P. und Håvarstein L. S.** (2007): Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nat Rev Microbiol* **5**(3): 219-229.
- Claverys J. P. und Martin B.** (1998): Competence regulons, genomics and streptococci. *Mol Microbiol* **29**(4): 1126-1127.
- Claverys J. P., Martin B. und Håvarstein L. S.** (2007): Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol Microbiol* **64**(6): 1423-1433.
- Claverys J. P., Prudhomme M. und Martin B.** (2006): Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 451-475.
- Cleveland W. S.** (1979): Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc* **74**: 829-836.
- Cobine P., Wickramasinghe W. A., Harrison M. D., Weber T., Solioz M. und 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. und Gilmore M. S.** (2003): The *Enterococcus faecalis* cytolyisin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* **5**(10): 661-669.
- Coburn P. S., Hancock L. E., Booth M. C. und Gilmore M. S.** (1999): A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolyisin. *Infect Immun* **67**(7): 3339-3347.
- Coffey T. J., Daniels M., McDougal L. K., Dowson C. G., Tenover F. C. und Spratt B. G.** (1995): Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6): 1306-1313.

- Coffey T. J., Dowson C. G., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B. G. und Musser J. M.** (1991): Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**(9): 2255-2260.
- Collins L. V., Kristian S. A., Weidenmaier C., Faigle M., Van Kessel K. P., Van Strijp J. A., Götz F., Neumeister B. und Peschel A.** (2002): *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis* **186**(2): 214-219.
- Contreras-Martel C., Dahout-Gonzalez C., Martins Ados S., Kotnik M. und Dessen A.** (2009): PBP active site flexibility as the key mechanism for β -lactam resistance in pneumococci. *J Mol Biol* **387**(4): 899-909.
- Contreras-Martel C., Job V., di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2006): Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **355**(4): 684-696.
- Cundell D. R., Pearce B. J., Sandros J., Naughton A. M. und Masure H. R.** (1995): Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun* **63**(7): 2493-2498.
- D'Elia M. A., Millar K. E., Beveridge T. J. und Brown E. D.** (2006): Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**(23): 8313-8316.
- Dagkessamanskaia A., Moscoso M., Henard V., Guiral S., Overweg K., Reuter M., Martin B., Wells J. und Claverys J. P.** (2004): Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol* **51**(4): 1071-1086.
- Daniels M. J., Turner-Cavet J. S., Selkirk R., Sun H., Parkinson J. A., Sadler P. J. und Robinson N. J.** (1998): Coordination of Zn^{2+} (and Cd^{2+}) by prokaryotic metallothionein. Involvement of histimidazole. *J Biol Chem* **273**(36): 22957-22961.
- Dawson M. H. und Sia R. H.** (1931): *In vitro* transformation of pneumococcal types: I. a technique for inducing transformation of pneumococcal types *in vitro*. *J Exp Med* **54**(5): 681-699.
- de Melo M. C., Sá Figueiredo A. M. und Ferreira-Carvalho B. T.** (2003): Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. *J Med Microbiol* **52**(Pt 3): 251-258.
- de Saizieu A., Gardes C., Flint N., Wagner C., Kamber M., Mitchell T. J., Keck W., Amrein K. E. und Lange R.** (2000): Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* **182**(17): 4696-4703.
- Denapaite D., Chi F., Maurer P., Nolte O. und Hakenbeck R.** (2007): Mechanism of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: targets, gene transfer, and mutations. In *Molecular biology of streptococci*. Hakenbeck, R. und Chhatwal, G. S. (Hrsg.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 290-303.
- Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J. und Dideberg O.** (2001): Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J Biol Chem* **276**(48): 45106-45112.
- Díaz E., López R. und García J. L.** (1990): Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(20): 8125-8129.
- Dintilhac A., Alloing G., Granadel C. und 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.
- Dower W. J., Miller J. F. und Ragsdale C. W.** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**(13): 6127-6145.
- Dowhan W.** (1997): Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* **66**: 199-232.

- Dowson C. G., Coffey T. J., Kell C. und Whiley R. A.** (1993): Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* **9**(3): 635-643.
- Dowson C. G., Hutchison A., Brannigan J. A., George R. C., Hansman D., Liñares J., Tomasz A., Smith J. M. und Spratt B. G.** (1989a): Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8842-8846.
- Dowson C. G., Hutchison A. und Spratt B. G.** (1989b): Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **3**(1): 95-102.
- Dowson C. G., Hutchison A. und Spratt B. G.** (1989c): Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Nucleic Acids Res* **17**(18): 7518.
- Dowson C. G., Hutchison A., Woodford N., Johnson A. P., George R. C. und 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 U S A* **87**(15): 5858-5862.
- Dowson C. G., Johnson A. P., Cercenado E. und George R. C.** (1994): Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin-resistant and penicillin-susceptible. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(1): 49-53.
- Doyle R. J.** (1989): How cell walls of gram-positive bacteria interact with metal ions. In *Metal ions and bacteria*. Beveridge, T. J. und Doyle, R. J. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y. 275-293.
- du Plessis M., Bingen E. und Klugman K. P.** (2002): Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8): 2349-2357.
- du Plessis M., Smith A. M. und Klugman K. P.** (2000): Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **6**(2): 127-131.
- Dubnau D.** (1999): DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**: 217-244.
- Dubnau D. und Losick R.** (2006): Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* **61**(3): 564-572.
- Dubnau D. und Lovett C. M.** (2002): Transformation and recombination. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. und Losick, R. (Hrsg.). ASM Press, Washington, DC.
- Dudoit S., Yang Y. H., Speed T. P. und Callow M. J.** (2002): Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**: 111-139.
- Dutta R. und Inouye M.** (1996): Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase-/phosphatase⁺ mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**(3): 1424-1429.
- Ebbole D. J. und Zalkin H.** (1987): Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for de novo purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem* **262**(17): 8274-8287.
- Ebbole D. J. und Zalkin H.** (1988): Detection of *pur* operon-attenuated mRNA and accumulated degradation intermediates in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **263**(22): 10894-10902.
- Ebbole D. J. und Zalkin H.** (1989): Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis pur* operon. *J Biol Chem* **264**(6): 3553-3561.
- Eberhardt C., Kuerschner L. und Weiss D. S.** (2003): Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase *in vivo* with β -lactams. *J Bacteriol* **185**(13): 3726-3734.

- Echenique J., Kadioglu A., Romao S., Andrew P. W. und Trombe M. C.** (2004): Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**(4): 2434-2437.
- Echenique J. R., Chapuy-Regaud S. und Trombe M. C.** (2000): Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol Microbiol* **36**(3): 688-696.
- Echenique J. R. und Trombe M. C.** (2001a): Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction. *J Bacteriol* **183**(2): 768-772.
- Echenique J. R. und Trombe M. C.** (2001b): Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol* **183**(15): 4599-4608.
- Eldholm V., Johnsborg O., Haugen K., Ohnstad H. S. und Håvarstein L. S.** (2009): Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* **155**(Pt 7): 2223-2234.
- Eriksen K. R.** (1945): Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type 1. *Acta Pathol Microbiol Scand* **22**: 398-401.
- Feldman C. und Klugman K.** (1997): Pneumococcal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **10**: 109-115.
- Filipe S. R. und Tomasz A.** (2000): Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4891-4896.
- Fischer H. und Tomasz A.** (1984): Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with β -lactam antibiotics. *J Bacteriol* **157**(2): 507-513.
- Fischer H. und Tomasz A.** (1985): Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **163**(1): 46-54.
- Fischer W.** (1997): Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb Drug Resist* **3**(4): 309-325.
- Fischer W., Behr T., Hartmann R., Peter-Katalinic J. und Egge H.** (1993): Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem* **215**(3): 851-857.
- Fleming A.** (1980): 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, 1929. *Rev Infect Dis* **2**(1): 129-139.
- Fontana R., Cerini R., Longoni P., Grossato A. und Canepari P.** (1983): Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. *J Bacteriol* **155**(3): 1343-1350.
- Fox P. M., Climo M. W. und Archer G. L.** (2007): Lack of relationship between purine biosynthesis and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a cautionary tale for microarray interpretation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(4): 1274-1280.
- Fraipont C., Adam M., Nguyen-Disteche M., Keck W., Van Beeumen J., Ayala J. A., Granier B., Hara H. und Ghuysen J. M.** (1994): Engineering and overexpression of periplasmic forms of the penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Biochem J* **298** (Pt 1): 189-195.
- Frohman M. A., Dush M. K. und Martin G. R.** (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 8998-9002.
- Galperin M. Y.** (2006): Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**(12): 4169-4182.
- García-Bustos J. und Tomasz A.** (1990): A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5415-5419.

- García-Bustos J. F., Chait B. T. und Tomasz A.** (1988): Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol* **170**(5): 2143-2147.
- García J. L., García E. und López R.** (1987): Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Microbiol* **149**(1): 52-56.
- García J. L., Sánchez-Beato A. R., Medrano F. J. und López R.** (1998): Versatility of choline-binding domain. *Microb Drug Resist* **4**(1): 25-36.
- García J. L., Sánchez-Puelles J. M., García P., López R., Ronda C. und García E.** (1986): Molecular characterization of an autolysin-defective mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* **137**(2): 614-619.
- García P., Paz Gonzalez M., García E., García J. L. und López R.** (1999): The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol* **33**(1): 128-138.
- Gasc A. M., Kauc L., Barraille P., Sicard M. und Goodgal S.** (1991): Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**(22): 7361-7367.
- Gasc A. M., Sicard N., Claverys J. P. und Sicard A. M.** (1980): Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutat Res* **70**(2): 157-165.
- Ghuysen J. M.** (1991): Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**: 37-67.
- Giammarinaro P., Sicard M. und Gasc A. M.** (1999): Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145** (Pt 8): 1859-1869.
- Giles A. F. und Reynolds R. E.** (1979): *Bacillus megaterium* resistance to cloxacillin accompanied by a compensatory change in penicillin-binding proteins. *Nature* **280**(5718): 167-168.
- Gillespie S. H.** (2001): Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int J Antimicrob Agents* **17**(3): 171-176.
- Gillespie S. H., Völker L. L. und Dickens A.** (2002): Evolutionary barriers to quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **8**(2): 79-84.
- Gilmore M. S., Segarra R. A., Booth M. C., Bogie C. P., Hall L. R. und 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.
- Glauner B., Höltje J. V. und Schwarz U.** (1988): The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**(21): 10088-10095.
- Goffin C. und Ghuysen J. M.** (1998): Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1079-1093.
- Goffin C. und Ghuysen J. M.** (2002): Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyl-transferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 702-738, table of contents.
- Gordon E., Mouz N., Duee E. und Dideberg O.** (2000): The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**(2): 477-485.
- Grangette C., Nutten S., Palumbo E., Morath S., Hermann C., Dewulf J., Pot B., Hartung T., Hols P. und Mercenier A.** (2005): Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10321-10326.
- Gratten M., Naraqi S. und Hansman D.** (1980): High prevalence of penicillin-insensitive pneumococci in Port Moresby, Papua New Guinea. *Lancet* **2**(8187): 192-195.

- Grebe T. und Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(4): 829-834.
- Grebe T., Paik J. und Hakenbeck R.** (1997): A novel resistance mechanism against β -lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol* **179**(10): 3342-3349.
- Grebe T. W. und Stock J. B.** (1999): The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**: 139-227.
- Griffith F.** (1928): The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**: 113-159.
- Groh S.** (2002): Cefotaxim-resistente Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*: Beitrag der Histidinkinase CiaH und der Serinprotease HtrA zum Phänotyp der Mutanten C102 und C202. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Gross M., Cramton S. E., Götz F. und Peschel A.** (2001): Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* **69**(5): 3423-3426.
- Grundling A. und Schneewind O.** (2007): Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**(6): 2521-2530.
- Guenzi E., Gasc A. M., Sicard M. A. und Hakenbeck R.** (1994): A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**(3): 505-515.
- Guenzi E. und Hakenbeck R.** (1995): Genetic competence and susceptibility to β -lactam antibiotics in *Streptococcus pneumoniae* R6 are linked via a two-component signal-transducing system *cia*. *Dev Biol Stand* **85**: 125-128.
- Guerout-Fleury A. M., Shazand K., Frandsen N. und Stragier P.** (1995): Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**(1-2): 335-336.
- Guiral S., Henard V., Granadel C., Martin B. und Claverys J. P.** (2006): Inhibition of competence development in *Streptococcus pneumoniae* by increased basal-level expression of the ComDE two-component regulatory system. *Microbiology* **152**(Pt 2): 323-331.
- Guiral S., Mitchell T. J., Martin B. und Claverys J. P.** (2005): Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8710-8715.
- Guzman L. M., Weiss D. S. und Beckwith J.** (1997): Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**(16): 5094-5103.
- Haas W., Kaushal D., Sublett J., Obert C. und Tuomanen E. I.** (2005): Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**(23): 8205-8210.
- Haenni M., Majcherczyk P. A., Barblan J. L. und Moreillon P.** (2006): Mutational analysis of class A and class B penicillin-binding proteins in *Streptococcus gordonii*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12): 4062-4069.
- Haenni M. und Moreillon P.** (2006): Mutations in penicillin-binding protein (PBP) -genes and in non-PBP-genes during selection of penicillin-resistant *Streptococcus gordonii*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12): 4053-4061.
- Haenni M., Moreillon P. und Lazarevic V.** (2007): Promoter and transcription analysis of penicillin-binding protein genes in *Streptococcus gordonii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(8): 2774-2783.
- Hakenbeck R.** (1998): Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae*. *Chemotherapy* **7**(2): 43-49.
- Hakenbeck R., Briese T., Chalkley L., Ellerbrok H., Kalliokoski R., Latorre C., Leinonen M. und Martin C.** (1991): Variability of penicillin-binding proteins from penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **164**(2): 307-312.

- Hakenbeck R., Briese T. und Ellerbrok H.** (1986): Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem* **157**(1): 101-106.
- Hakenbeck R., Ellerbrok H., Martin C., Morelli G., Schuster G., Severin A. und Tomasz A.** (1993): Penicillin-binding protein 1a and 3 in *Streptococcus pneumoniae*: what are essential PBPs. In Bacterial growth and lysis metabolism and structure of the bacterial sacculus. de Pedro, M. A., Höltje, J.-V. und Löffelhardt, W. (Hrsg.). Plenum Press, New York. 335-340.
- Hakenbeck R., Grebe T., Zähler D. und Stock J. B.** (1999): β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* **33**(4): 673-678.
- Hakenbeck R. und Kohiyama M.** (1982): Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* **127**(2): 231-236.
- Hakenbeck R., König A., Kern I., van der Linden M., Keck W., Billot-Klein D., Legrand R., Schoot B. und Gutmann L.** (1998): Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**(7): 1831-1840.
- Hakenbeck R., Martin C., Dowson C. und Grebe T.** (1994): Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J Bacteriol* **176**(17): 5574-5577.
- Hakenbeck R. und Stock J. B.** (1996): Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol* **273**: 281-300.
- Hakenbeck R., Tarpay M. und Tomasz A.** (1980): Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **17**(3): 364-371.
- Hakenbeck R., Tornette S. und Adkinson N. F.** (1987): Interaction of non-lytic β -lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**(3): 755-760.
- Halfmann A.** (2004): Evaluierung eines Reportersystems für *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Halfmann A.** (2008): Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Halfmann A., Kovács M., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2007): 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.
- Hansman D. und Bullen M. M.** (1967): A resistant pneumococcus *Lancet* **ii**: 264-265.
- Hansman D., Devitt L., Miles H. und Riley I.** (1974): Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med J Aust* **2**(10): 353-356.
- Hansman D., Glasgow H. N., Sturt J., Devitt L. und Douglas R. M.** (1971): Pneumococci insensitive to penicillin. *Nature* **230**(5293): 407-408.
- Hardie J. M. und Whiley R. A.** (1995): The genus *Streptococcus* In The genera of lactic acid bacteria. Wood, B. J. B. und Holtzapfel, W. H. (Hrsg.). Blackie Academic & Professional 55-124.
- Hava D. L. und Camilli A.** (2002): Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **45**(5): 1389-1406.
- Håvarstein L. S.** (1998): Identification of a competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* by genomic analysis. *Trends Microbiol* **6**(8): 297-299; discussion 299-300.
- Håvarstein L. S., Coomaraswamy G. und Morrison D. A.** (1995a): An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11140-11144.

- Håvarstein L. S., Diep D. B. und Nes I. F.** (1995b): A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* **16**(2): 229-240.
- Håvarstein L. S., Martin B., Johnsborg O., Granadel C. und Claverys J. P.** (2006): New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* **59**(4): 1297-1307.
- Heintz M.** (2006): Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Higuchi R., Krummel B. und Saiki R. K.** (1988): A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**(15): 7351-7367.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K. und Pease L. R.** (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1): 51-59.
- Hoch J. A.** (2000): Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 165-170.
- Hochberg Y.** (1988): A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* **75**: 800-802.
- Holm S.** (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* **6**: 65-70.
- Höltje J. V.** (1996a): A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142** (Pt 8): 1911-1918.
- Höltje J. V.** (1996b): Molecular interplay of murein synthases and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* **2**(1): 99-103.
- Höltje J. V.** (1998): Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 181-203.
- Höltje J. V. und Tomasz A.** (1976): Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem* **251**(14): 4199-4207.
- 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., McHenry 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. und Glass J. I.** (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**(19): 5709-5717.
- Hoskins J., Matsushima P., Mullen D. L., Tang J., Zhao G., Meier T. I., Nicas T. I. und Jaskunas S. R.** (1999): Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**(20): 6552-6555.
- Hotchkiss R. D.** (1954): Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**(2): 49-55.
- Hotchkiss R. D. und Ephrussi-Taylor H.** (1951): Use of serum albumin as source of serum factor in pneumococcal transformation. *Fed Proc* **10**: 200.
- Hübscher J., Jansen A., Kotte O., Schäfer J., Majcherczyk P. A., Harris L. G., Bierbaum G., Heine-mann M. und Berger-Bachi B.** (2007): Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* **8**: 307.
- Hughes A. H., Hancock I. C. und Baddiley J.** (1973): The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem J* **132**(1): 83-93.

- Hui F. M. und Morrison D. A. (1993): Identification of a *purC* gene from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **175**(19): 6364-6367.
- Hui F. M., Zhou L. und 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.
- Huls P. G., Vischer N. O. und Woldringh C. L. (1999): Delayed nucleoid segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**(5): 959-970.
- Ibrahim Y. M., Kerr A. R., McCluskey J. und Mitchell T. J. (2004a): Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**(16): 5258-5266.
- Ibrahim Y. M., Kerr A. R., McCluskey J. und Mitchell T. J. (2004b): Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**(6): 3584-3591.
- Ishiguro E. E. und Ramey W. D. (1976): Stringent control of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **127**(3): 1119-1126.
- Jabes D., Nachman S. und Tomasz A. (1989): Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* **159**(1): 16-25.
- Jacobs M. R., Koornhof H. J., Robins-Browne R. M., Stevenson C. M., Vermaak Z. A., Freiman I., Miller G. B., Witcomb M. A., Isaacson M., Ward J. I. und Austrian R. (1978): Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* **299**(14): 735-740.
- Jamin M., Damblon C., Millier S., Hakenbeck R. und Frère J. M. (1993): Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with β -lactams. *Biochem J* **292** (Pt 3): 735-741.
- Janoff E. N. und Rubins J. B. (2004): Immunodeficiency and invasive pneumococcal disease. In *The pneumococcus*. Tuomanen, E. I., Mitchell, T. J., Morrison, D. A. und Spratt, B. G. (Hrsg.). ASM Press, Washington, DC. 252-280.
- Jayaraman G. C., Penders J. E. und Burne R. A. (1997): Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol* **25**(2): 329-341.
- Job V., Carapito R., Vernet T., Dessen A. und Zapun A. (2008): Common alterations in PBP1a from resistant *Streptococcus pneumoniae* decrease its reactivity toward β -lactams: structural insights. *J Biol Chem* **283**(8): 4886-4894.
- Job V., di Guilmi A. M., Martin L., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A. (2003): Structural studies of the transpeptidase domain of PBP1a from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 6): 1067-1069.
- Johnsborg O., Eldholm V. und Håvarstein L. S. (2007): Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**(10): 767-778.
- Jones G. und Dyson P. (2006): Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: inside versus outside. *J Bacteriol* **188**(21): 7470-7476.
- Jonquieres R., Bierne H., Fiedler F., Gounon P. und Cossart P. (1999): Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**(5): 902-914.
- Jordan S., Hutchings M. I. und Mascher T. (2008): Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**(1): 107-146.
- Jung K. und Altendorf K. (1998): Truncation of amino acids 12-128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**(28): 17406-17410.

- Kausmally L., Johnsborg O., Lunde M., Knutsen E. und Håvarstein L. S.** (2005): Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol* **187**(13): 4338-4345.
- Kawamura Y., Hou X. G., Sultana F., Miura H. und 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.
- Kazmierczak K. M., Wayne K. J., Rechtsteiner A. und Winkler M. E.** (2009): Roles of *rel* in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **72**(3): 590-611.
- Keipert V.** (2009): Untersuchung der genetischen Kompetenz bei *Streptococcus mitis* B6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Kell C. M., Sharma U. K., Dowson C. G., Town C., Balganesch T. S. und Spratt B. G.** (1993): Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **106**(2): 171-175.
- Kerr A. R., Adrian P. V., Estevao S., de Groot R., Alloing G., Claverys J. P., Mitchell T. J. und Hermans P. W.** (2004): The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect Immun* **72**(7): 3902-3906.
- Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., Håvarstein L. S., Bek-Thomsen M., Tettelin H. und Sørensen U. B.** (2008): Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One* **3**(7): e2683.
- Kilstrup M. und Martinussen J.** (1998): A transcriptional activator, homologous to the *Bacillus subtilis* PurR repressor, is required for expression of purine biosynthetic genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**(15): 3907-3916.
- Kislak J. W., Razavi L. M., Daly A. K. und Finland M.** (1965): Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* **250**(3): 261-268.
- Kloosterman T. G., Hendriksen W. T., Bijlsma J. J., Bootsma H. J., van Hijum S. A., Kok J., Hermans P. W. und Kuipers O. P.** (2006): Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **281**(35): 25097-25109.
- Kloosterman T. G., Witwicki R. M., van der Kooi-Pol M. M., Bijlsma J. J. und Kuipers O. P.** (2008): Opposite effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **190**(15): 5382-5393.
- Klugman K. P.** (1990): Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* **3**(2): 171-196.
- Koch B.** (2006): Biochemische und genetische Charakterisierung der PBP2x Mutanten C405, C503 und C606 von *Streptococcus pneumoniae* R6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Kovács M.** (2009): Die kleinen nichtkodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Kovács M., Halfmann A., Fedtke I., Heintz M., Peschel A., Vollmer W., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2006): A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**(16): 5797-5805.
- Krauß J.** (1996): Charakterisierung von Mutationen Penicillin-bindender Proteine in Cefotaxim-resistenten Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Krauß J. und Hakenbeck R.** (1997): A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. *Antimicrob Agents Chemother* **41**(5): 936-942.
- Krauß J., van der Linden M., Grebe T. und Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2**(2): 183-186.

- Kusser W. und Ishiguro E. E.** (1987): Suppression of mutations conferring penicillin tolerance by interference with the stringent control mechanism of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(9): 4396-4398.
- Lacks S. und Hotchkiss R. D.** (1960): A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* **39**: 508-518.
- Lacks S. und Neuberger M.** (1975): Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **124**(3): 1321-1329.
- Lacks S. A. und Greenberg B.** (2001): Constitutive competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* caused by mutation of a transmembrane histidine kinase. *Mol Microbiol* **42**(4): 1035-1045.
- Laemmli U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Laible G. und Hakenbeck R.** (1987): Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **1**(3): 355-363.
- Laible G. und Hakenbeck R.** (1991): Five independent combinations of mutations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**(21): 6986-6990.
- Laible G., Hakenbeck R., Sicard M. A., Joris B. und Ghuysen J. M.** (1989): Nucleotide sequences of the *pbpX* genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant, C506. *Mol Microbiol* **3**(10): 1337-1348.
- Laible G., Spratt B. G. und Hakenbeck R.** (1991): Interspecies recombinational events during the evolution of altered *pbp2x* genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**(8): 1993-2002.
- Lambert P. A., Hancock I. C. und Baddiley J.** (1975): Influence of alanyl ester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acids. *Biochem J* **151**(3): 671-676.
- Lancefield R. C.** (1933): A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**(4): 571-595.
- Lange R., Wagner C., de Saizieu A., Flint N., Molnos J., Stieger M., Caspers P., Kamber M., Keck W. und Amrein K. E.** (1999): Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**(1): 223-234.
- Lanie J. A., Ng W. L., Kazmierczak K. M., Andrzejewski T. M., Davidsen T. M., Wayne K. J., Tettelin H., Glass J. I. und Winkler M. E.** (2007): Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**(1): 38-51.
- Lau P. C., Sung C. K., Lee J. H., Morrison D. A. und Cvitkovitch D. G.** (2002): PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *J Microbiol Methods* **49**(2): 193-205.
- Lazazzera B. A. und Grossman A. D.** (1998): The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* **6**(7): 288-294.
- LeBlanc D. J., Lee L. N. und 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. und 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.
- Lee M. S., Seok C. und Morrison D. A.** (1998): Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. *Appl Environ Microbiol* **64**(12): 4796-4802.
- Lenski R. E.** (1997): The cost of antibiotic resistance - from the perspective of a bacterium. *Ciba Found Symp* **207**: 131-140; discussion 141-151.

- Łęski T. A. und Tomasz A.** (2005): Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *J Bacteriol* **187**(5): 1815-1824.
- Levin B. R., Perrot V. und Walker N.** (2000): Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**(3): 985-997.
- Liu H. H. und Tomasz A.** (1985): Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **152**(2): 365-372.
- López R. und García E.** (2004): Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* **28**(5): 553-580.
- Lorenz M. G. und Wackernagel W.** (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**(3): 563-602.
- Lu W. P., Kincaid E., Sun Y. und Bauer M. D.** (2001): Kinetics of β -lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation in β -lactam resistance. *J Biol Chem* **276**(34): 31494-31501.
- Luo P., Li H. und Morrison D. A.** (2004): Identification of ComW as a new component in the regulation of genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **54**(1): 172-183.
- Luo P. und 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.
- Lux T., Nuhn M., Hakenbeck R. und Reichmann P.** (2007): Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**(21): 7741-7751.
- MacFadyen L. P., Chen D., Vo H. C., Liao D., Sinotte R. und Redfield R. J.** (2001): Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Mol Microbiol* **40**(3): 700-707.
- Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O. und Dessen A.** (2006): Penicillin-binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* **30**(5): 673-691.
- Macheboeuf P., di Guilmi A. M., Job V., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2005): Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 577-582.
- Maes M. und Messens E.** (1992): Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res* **20**(16): 4374.
- Marmur J.** (1961): A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**: 202-218.
- Marra A., Lawson S., Asundi J. S., Brigham D. und Hromockyj A. E.** (2002): *In vivo* characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* **148**(Pt 5): 1483-1491.
- Marrec-Fairley M., Piette A., Gallet X., Bresseur R., Hara H., Fraipont C., Ghuysen J. M. und Nguyen-Disteche M.** (2000): Differential functionalities of amphiphilic peptide segments of the cell-septation penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37**(5): 1019-1031.
- Martin B., García P., Castanie M. P., Glise B. und Claverys J. P.** (1995): The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls an SOS regulon. *Dev Biol Stand* **85**: 293-300.
- Martin B., Prudhomme M., Alloing G., Granadel C. und Claverys J. P.** (2000): Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **38**(4): 867-878.

- Martin C., Sibold C. und Hakenbeck R.** (1992): Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *Embo J* **11**(11): 3831-3836.
- Martínez B., Fernandez M., Suarez J. E. und Rodríguez A.** (1999): Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology* **145** (Pt **11**): 3155-3161.
- Mascher T.** (2001): Das *cia*-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Mascher T., Heintz M., Zähner D., Merai M. und Hakenbeck R.** (2006): The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in β -lactam resistance. *J Bacteriol* **188**(5): 1959-1968.
- Mascher T., Zähner D., Merai M., Balmelle N., de Saizieu A. B. und Hakenbeck R.** (2003): The *Streptococcus pneumoniae* *cia*-regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* **185**(1): 60-70.
- Massidda O., Anderluzzi D., Friedli L. und Feger G.** (1998): Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144** (Pt **11**): 3069-3078.
- Maurer P., Koch B., Zerfaß I., Krauß J., van der Linden M., Frère J. M., Contreras-Martel C. und Hakenbeck R.** (2008): Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: three new mutational pathways for remodelling an essential enzyme into a resistance determinant. *J Mol Biol* **376**(5): 1403-1416.
- McDougal L. K., Rasheed J. K., Biddle J. W. und Tenover F. C.** (1995): Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(10): 2282-2288.
- McKee C. M. und Houck C. L.** (1943): Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. *Proc Soc Exp Biol Med* **53**: 33-34.
- McKessar S. J. und Hakenbeck R.** (2007): The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **189**(4): 1342-1350.
- Merai M.** (2003): Analyse von Zielgenen des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Miller C., Thomsen L. E., Gaggero C., Mosseri R., Ingmer H. und Cohen S. N.** (2004): SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**(5690): 1629-1631.
- Mongodin E., Finan J., Climo M. W., Rosato A., Gill S. und Archer G. L.** (2003): Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* **185**(15): 4638-4643.
- Morath S., Geyer A. und Hartung T.** (2001): Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* **193**(3): 393-397.
- Morlot C., Noirclerc-Savoye M., Zapun A., Dideberg O. und Vernet T.** (2004): The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**(6): 1641-1648.
- Morlot C., Pernot L., Le Gouellec A., di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2005): Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **280**(16): 15984-15991.
- Morlot C., Zapun A., Dideberg O. und Vernet T.** (2003): Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**(3): 845-855.

- Moscoso M. und Claverys J. P.** (2004): Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol* **54**(3): 783-794.
- Mosser J. L. und Tomasz A.** (1970): Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* **245**(2): 287-298.
- Mouz N., di Guilmi A. M., Gordon E., Hakenbeck R., Dideberg O. und Vernet T.** (1999): Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for β -lactam antibiotics. *J Biol Chem* **274**(27): 19175-19180.
- Mouz N., Gordon E., di Guilmi A. M., Petit I., Petillot Y., Dupont Y., Hakenbeck R., Vernet T. und Dideberg O.** (1998): Identification of a structural determinant for resistance to β -lactam antibiotics in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13403-13406.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mullis K. B. und Faloona F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Muñoz R., Dowson C. G., Daniels M., Coffey T. J., Martin C., Hakenbeck R. und Spratt B. G.** (1992a): Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **6**(17): 2461-2465.
- Muñoz R., Musser J. M., Crain M., Briles D. E., Marton A., Parkinson A. J., Sørensen U. und Tomasz A.** (1992b): Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* **15**(1): 112-118.
- 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 T., Popham D. L. und Setlow P.** (1997): Identification and characterization of *pbpA* encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 2A. *J Bacteriol* **179**(9): 3021-3029.
- Musher D. M.** (1992): Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* **14**(4): 801-807.
- Musher D. M., Breiman R. F. und Tomasz A.** (2000): *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21st century. In *Streptococcus pneumoniae*. Tomasz, A. (Hrsg.). Mary Ann Liebert, Larchmont, USA.
- Nagai K., Davies T. A., Jacobs M. R. und Appelbaum P. C.** (2002): Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5): 1273-1280.
- Neufeld F., Schnitzer R., in Kolle W. und von Wassermann A.** (1928): Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Gustav Fischer, Jena.
- Neuhaus F. C. und Baddiley J.** (2003): A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 686-723.
- Ng W. L., Kazmierczak K. M., Robertson G. T., Gilmour R. und Winkler M. E.** (2003): Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol* **185**(1): 359-370.
- Nilsson D. und Kilstrup M.** (1998): Cloning and expression of the *Lactococcus lactis purDEK* genes, required for growth in milk. *Appl Environ Microbiol* **64**(11): 4321-4327.

- Nouaille S., Commissaire J., Gratadoux J. J., Ravn P., Bolotin A., Gruss A., Le Loir Y. und Langella P.** (2004): Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* **70**(3): 1600-1607.
- Novak R., Braun J. S., Charpentier E. und Tuomanen E.** (1998): Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol* **29**(5): 1285-1296.
- Novak R., Cauwels A., Charpentier E. und 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.
- Oberhettinger P.** (2007): Konstruktion und Charakterisierung eines Integrationsvektors zur induzierbaren Expression klonierter Gene in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Odermatt A. und Solioz M.** (1995): Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **270**(9): 4349-4354.
- Ogura T., Bouloc P., Niki H., D'Ari R., Hiraga S. und Jaffe A.** (1989): Penicillin-binding protein 2 is essential in wild-type *Escherichia coli* but not in *lov* or *cya* mutants. *J Bacteriol* **171**(6): 3025-3030.
- Omburo G. A., Jacobitz S., Torphy T. J. und Colman R. W.** (1998): Critical role of conserved histidine pairs HNXXH and HDXXH in recombinant human phosphodiesterase 4A. *Cell Signal* **10**(7): 491-497.
- Osaki M., Arcondeguy T., Bastide A., Touriol C., Prats H. und Trombe M. C.** (2009): The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: cellular organization and physiological characterization. *J Bacteriol* **191**(15): 4943-4950.
- Ottolenghi E. und Hotchkiss R. D.** (1962): Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med* **116**: 491-519.
- Pagliero E., Chesnel L., Hopkins J., Croize J., Dideberg O., Vernet T. und di Guilmi A. M.** (2004): Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1848-1855.
- Paik J., Kern I., Lurz R. und Hakenbeck R.** (1999): Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **181**(12): 3852-3856.
- Pares S., Mouz N., Petillot Y., Hakenbeck R. und Dideberg O.** (1996): X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**(3): 284-289.
- Park I. H., Pritchard D. G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M. C. und Nahm M. H.** (2007): Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **45**(4): 1225-1233.
- Parkinson J. S.** (1993): Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**(5): 857-871.
- Parkinson J. S. und Kofoid E. C.** (1992): Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**: 71-112.
- Patterson M. J.** (1991): *Streptococcus*. In Medical Microbiology. Baron, S. (Hrsg.). Churchill Livingstone, New York, USA.
- Pearce B. J., Naughton A. M. und Masure H. R.** (1994): Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**(6): 881-892.
- Peltonen T. und Mantsala P.** (1999): Isolation and characterization of a *purC*(orf)*QLF* operon from *Lactococcus* [correction of *Lactobacillus*] *lactis* MG1614. *Mol Gen Genet* **261**(1): 31-41.
- Perego M.** (1998): Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol* **6**(9): 366-370.

- Perego M., Hanstein C., Welsh K. M., Djavakhishvili T., Glaser P. und Hoch J. A.** (1994): Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**(6): 1047-1055.
- Perez-Trallero E., Fernandez-Mazarrasa C., García-Rey C., Bouza E., Aguilar L., García-de-Lomas J. und Baquero F.** (2001): Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(12): 3334-3340.
- Pernot L., Chesnel L., Le Gouellec A., Croize J., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2004): A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to β -lactam antibiotics. *J Biol Chem* **279**(16): 16463-16470.
- Peschel A., Otto M., Jack R. W., Kalbacher H., Jung G. und Götz F.** (1999): Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**(13): 8405-8410.
- Peschel A., Vuong C., Otto M. und Götz F.** (2000): The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(10): 2845-2847.
- Pestova E. V., Håvarstein L. S. und 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.
- Peters K.** (2009): Promotoridentifikation und Expressionsanalyse von Genen der Penicillin-bindenden Proteine in *S. pneumoniae* R6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Peterson S., Cline R. T., Tettelin H., Sharov V. und 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. und Morrison D. A.** (2004): Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol* **51**(4): 1051-1070.
- Piette A., Fraipont C., Den Blaauwen T., Aarsman M. E., Pastoret S. und Nguyen-Disteche M.** (2004): Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**(18): 6110-6117.
- Piñas G. E., Cortes P. R., Orío A. G. und Echenique J.** (2008): Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **154**(Pt 5): 1300-1308.
- Pinho M. G., de Lencastre H. und Tomasz A.** (2000): Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**(4): 1074-1079.
- Pinho M. G., de Lencastre H. und Tomasz A.** (2001): An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10886-10891.
- Pinho M. G. und Errington J.** (2005): Recruitment of penicillin-binding protein PBP2 to the division site of *Staphylococcus aureus* is dependent on its transpeptidation substrates. *Mol Microbiol* **55**(3): 799-807.
- Potgieter E. und Chalkley L. J.** (1995): Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **1**(1): 35-42.
- Poyart C., Pellegrini E., Marceau M., Baptista M., Jaubert F., Lamy M. C. und Trieu-Cuot P.** (2003): Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* **49**(6): 1615-1625.

- Prudhomme M., Attaiech L., Sánchez G., Martin B. und Claverys J. P.** (2006): Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**(5783): 89-92.
- Rane L. und Subbarow Y.** (1940): Nutritional Requirements of the Pneumococcus: I. Growth Factors for Types I, II, V, VII, VIII. *J Bacteriol* **40**(5): 695-704.
- Ravin A. W.** (1959): Reciprocal capsular transformations of pneumococci. *J Bacteriol* **77**(3): 296-309.
- Reichmann P. und Hakenbeck R.** (2000): Allelic variation in a peptide-inducible two-component system of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **190**(2): 231-236.
- Reichmann P., König A., Liñares J., Alcaide F., Tenover F. C., McDougal L., Swidsinski S. und Hakenbeck R.** (1997): A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **176**(4): 1001-1012.
- Reichmann P., König A., Marton A. und Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2**(2): 177-181.
- Renart J., Reiser J. und Stark G. R.** (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3116-3120.
- Reyes A., Leiva A., Cambiazo V., Mendez M. A. und Gonzalez M.** (2006): Cop-like operon: structure and organization in species of the Lactobacillale order. *Biol Res* **39**(1): 87-93.
- Rieux V., Carbon C. und Azoulay-Dupuis E.** (2001): Complex relationship between acquisition of β -lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **184**(1): 66-72.
- Rimini R., Jansson B., Feger G., Roberts T. C., de Francesco M., Gozzi A., Faggioni F., Domenici E., Wallace D. M., Frandsen N. und 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.
- Robinson V. L., Buckler D. R. und Stock A. M.** (2000): A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**(8): 626-633.
- Rogers P. D., Liu T. T., Barker K. S., Hilliard G. M., English B. K., Thornton J., Swiatlo E. und McDaniel L. S.** (2007): Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J Antimicrob Chemother* **59**(4): 616-626.
- Romao S., Memmi G., Oggioni M. R. und Trombe M. C.** (2006): LuxS impacts on LytA-dependent autolysis and on competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **152**(Pt 2): 333-341.
- Rozen D. E., McGee L., Levin B. R. und Klugman K. P.** (2007): Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 412-416.
- Rutschmann J., Maurer P. und Hakenbeck R.** (2007): Detection of penicillin-binding proteins. In *Molecular biology of streptococci*. Hakenbeck, R. und Chhatwal, G. S. (Hrsg.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 537-542.
- Sabelnikov A. G., Greenberg B. und Lacks S. A.** (1995): An extended -10 promoter alone directs transcription of the DpnII operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **250**(2): 144-155.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Salles C., Creancier L., Claverys J. P. und 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. und Maniatis T.** (1989): *Molecular cloning, a laboratory manual*. CSH Press, New York, USA.

- Sanbongi Y., Ida T., Ishikawa M., Osaki Y., Kataoka H., Suzuki T., Kondo K., Ohsawa F. und Yonezawa M.** (2004): Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2244-2250.
- Sánchez-Beato A. R., López R. und García J. L.** (1998): Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **164**(1): 207-214.
- Sánchez-Puelles J. M., Ronda C., García J. L., García P., López R. und García E.** (1986): Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* **158**(2): 289-293.
- Sánchez C., Hernandez de Rojas A., Martínez B., Arguelles M. E., Suarez J. E., Rodríguez A. und Mayo B.** (2000): Nucleotide sequence and analysis of pBL1, a bacteriocin-producing plasmid from *Lactococcus lactis* IPLA 972. *Plasmid* **44**(3): 239-249.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sasková L., Novakova L., Basler M. und Branny P.** (2007): Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**(11): 4168-4179.
- Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A. und Charlier P.** (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 234-258.
- 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.
- Schäfer F.** (2007): Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Der Einfluss der CiaRH regulierten Gene auf die genetische Kompetenz. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schähle Y.** (2005): Selektionierbarkeit und Gentransfer von PBP1a in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Scheffers D. J. und Errington J.** (2004): PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery. *J Bacteriol* **186**(15): 5153-5156.
- Scheller Y.** (2005): Protein-Protein-Interaktionen der Amino-terminalen Domäne des Penicillin-Bindeproteins 2b aus *Streptococcus pneumoniae* R6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schleifer K. H. und Ludwig W.** (1995): Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. In *The genera of lactic acid bacteria*. Wood, B. J. B. und Holzapfel, W. H. (Hrsg.). Blackie Academic & Professional.
- Schmitt G.** (2005): Molekulare Werkzeuge zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem regulatorischen Zwei-Komponenten-System CiaRH und der Lokalisation des Penicillin-Bindeproteins PBP2x in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schmitt M.** (2004): Charakterisierung antibiotikaresistenter oraler Streptokokken aus Frankreich. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schuster C., Dobrinski B. und Hakenbeck R.** (1990): Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J Bacteriol* **172**(11): 6499-6505.
- Sears L. E., Moran L. S., Kissinger C., Creasey T., Perry-O'Keefe H., Roskey M., Sutherland E. und Slatko B. E.** (1992): CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**(4): 626-633.

- Sebert M. E., Palmer L. M., Rosenberg M. und Weiser J. N.** (2002): Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **70**(8): 4059-4067.
- Sebert M. E., Patel K. P., Plotnick M. und Weiser J. N.** (2005): Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *J Bacteriol* **187**(12): 3969-3979.
- Seto H. und Tomasz A.** (1975): Protoplast formation and leakage of intramembrane cell components: induction by the competence activator substance of pneumococci. *J Bacteriol* **121**(1): 344-353.
- Seto H. und Tomasz A.** (1976): Calcium-requiring step in the uptake of deoxyribonucleic acid molecules through the surface of competent pneumococci. *J Bacteriol* **126**(3): 1113-1118.
- Severin A., Figueiredo A. M. und Tomasz A.** (1996): Separation of abnormal cell wall composition from penicillin resistance through genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**(7): 1788-1792.
- Severin A., Schuster C., Hakenbeck R. und Tomasz A.** (1992): Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **174**(15): 5152-5155.
- Severin A. und Tomasz A.** (1996): Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**(1): 168-174.
- Severin A. und Tomasz A.** (2000): The peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae*. In *Streptococcus pneumoniae - Molecular biology & Mechanism of disease*. Tomasz, A. (Hrsg.). Mary Ann Liebert, Inc. 179-195.
- Severin A., Vaz Pato M. V., Sá Figueiredo A. M. und Tomasz A.** (1995): Drastic changes in the peptidoglycan composition of penicillin-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **130**(1): 31-35.
- Shankar N., Coburn P., Pillar C., Haas W. und Gilmore M.** (2004): Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* **293**(7-8): 609-618.
- Sibold C., Henrichsen J., König A., Martin C., Chalkley L. und Hakenbeck R.** (1994): Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol* **12**(6): 1013-1023.
- Sibold C., Wang J., Henrichsen J. und Hakenbeck R.** (1992): Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect Immun* **60**(10): 4119-4126.
- 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**: 31-44.
- Sidak Z.** (1967): Rectangular confidence regions for the means of the multivariate normal distributions. *J Am Stat Assoc* **62**: 626-633.
- Sifaoui F., Kitzis M. D. und Gutmann L.** (1996): *In vitro* selection of one-step mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to different oral β -lactam antibiotics is associated with alterations of PBP2x. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(1): 152-156.
- Slatko B. E.** (1994): Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* **31**: 35-45.
- Smith A. M., Botha R. F., Koornhof H. J. und Klugman K. P.** (2001): Emergence of a pneumococcal clone with cephalosporin resistance and penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(9): 2648-2650.
- Smith A. M. und Klugman K. P.** (1998): Alterations in PBP1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(6): 1329-1333.
- Smith A. M. und Klugman K. P.** (2003): Site-specific mutagenesis analysis of PBP 1A from a penicillin-cephalosporin-resistant pneumococcal isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(1): 387-389.

- Smith A. M. und Klugman K. P.** (2005): Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level β -lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(11): 4622-4627.
- Smith A. M., Klugman K. P., Coffey T. J. und Spratt B. G.** (1993): Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **37**(9): 1938-1944.
- Song J. H., Ko K. S., Lee J. Y., Baek J. Y., Oh W. S., Yoon H. S., Jeong J. Y. und Chun J.** (2005): Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells* **19**(3): 365-374.
- Soualhine H., Brochu V., Menard F., Papadopoulou B., Weiss K., Bergeron M. G., Legare D., Drumme-smith J. und Ouellette M.** (2005): A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. *Mol Microbiol* **58**(5): 1430-1440.
- Steinmoen H., Knutsen E. und Håvarstein L. S.** (2002): Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7681-7686.
- Steinmoen H., Teigen A. und Håvarstein L. S.** (2003): Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J Bacteriol* **185**(24): 7176-7183.
- Stingle F. und Mollet B.** (1996): Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (*pbp2b*) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Mol Microbiol* **22**(2): 357-366.
- Stock A. M., Robinson V. L. und Goudreau P. N.** (2000): Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stock J. und Da Re S.** (2000): Signal transduction: response regulators on and off. *Curr Biol* **10**(11): R420-424.
- Stock J. B., Ninfa A. J. und Stock A. M.** (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**(4): 450-490.
- Stock J. B., Surette M. G., Levit M. und Park P.** (1995): Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In Two-component signal transduction. Hoch, J. A. und Silhavy, T. J. (Hrsg.). ASM Press, Washington, USA.
- Storey J. D. und Tibshirani R.** (2001): Estimate false discovery rates under dependence with applications to DNA microarrays. *Technical Reports*: 2001-2028.
- Strausak D. und Solioz M.** (1997): CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J Biol Chem* **272**(14): 8932-8936.
- Sung C. K., Li H., Claverys J. P. und Morrison D. A.** (2001): An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**(11): 5190-5196.
- Sung C. K. und Morrison D. A.** (2005): Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**(9): 3052-3061.
- Surette M. G., Levit M., Liu Y., Lukat G., Ninfa E. G., Ninfa A. und Stock J. B.** (1996): Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **271**(2): 939-945.
- Switzer R. L., Zalkin H. und Saxild H. H.** (2002): Purine, pyrimidine and pyridine nucleotide metabolism. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. und Losick, R. (Hrsg.). ASM Press, Washington, DC. 255-270.
- Terrak M., Ghosh T. K., van Heijenoort J., Van Beeumen J., Lampilas M., Aszodi J., Ayala J. A., Ghuysen J. M. und Nguyen-Disteche M.** (1999): The catalytic, glycosyl transferase and acyl trans-

- ferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**(2): 350-364.
- Terzaghi B. E. und Sandine W. E.** (1975): Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl Microbiol* **29**(6): 807-813.
- 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. und Fraser C. M.** (2001): Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**(5529): 498-506.
- Thanassi J. A., Hartman-Neumann S. L., Dougherty T. J., Dougherty B. A. und Pucci M. J.** (2002): Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **30**(14): 3152-3162.
- Thibessard A., Fernandez A., Gintz B., Leblond-Bourget N. und Decaris B.** (2002): Effects of *rodA* and *pbp2b* disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol* **184**(10): 2821-2826.
- Throup J. P., Koretke K. K., Bryant A. P., Ingraham K. A., Chalker A. F., Ge Y., Marra A., Wallis N. G., Brown J. R., Holmes D. J., Rosenberg M. und Burnham M. K.** (2000): A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**(3): 566-576.
- Tipper D. J. und 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 U S A* **54**(4): 1133-1141.
- Todd E. W. und Hewitt L. F.** (1932): A new culture medium for the production of anti- genic streptococcal hemolysin. . *J. Path. Sc. Bact.* **35**: 973-974.
- Tomasz A.** (1967): Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus. *Science* **157**(789): 694-697.
- Tomasz A.** (1968): Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**(1): 86-93.
- Tomasz A.** (1979): The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the β -lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**: 113-137.
- Tomasz A.** (1994): Benefit and risk in the β -lactam antibiotic-resistance strategies of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **2**(10): 380-385.
- Tomasz A. und Hotchkiss R. D.** (1964): Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 480-487.
- Tomasz A., McDonnell M., Westphal M. und Zanati E.** (1975): Coordinated incorporation of nascent peptidoglycan and teichoic acid into pneumococcal cell walls and conservation of peptidoglycan during growth. *J Biol Chem* **250**(1): 337-341.
- Tomasz A., Moreillon P. und Pozzi G.** (1988): Insertional inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **170**(12): 5931-5934.
- Tomasz A. und Waks S.** (1975): Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(10): 4162-4166.
- Tomasz A. und Westphal M.** (1971): Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(11): 2627-2630.
- Tomasz A. und Zanati E.** (1971): Appearance of a protein "agglutinin" on the spheroplast membrane of pneumococci during induction of competence. *J Bacteriol* **105**(3): 1213-1215.

- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Trombe M. C., Clave C. und Manias J. M.** (1992): Calcium regulation of growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **138**(1): 77-84.
- Tseng H. J., McEwan A. G., Paton J. C. und Jennings M. P.** (2002): Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* **70**(3): 1635-1639.
- Usobiaga P., Medrano F. J., Gasset M., García J. L., Saiz J. L., Rivas G., Laynez J. und Menendez M.** (1996): Structural organization of the major autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **271**(12): 6832-6838.
- Vanderwel D. und Ishiguro E. E.** (1984): Properties of cell wall peptidoglycan synthesized by amino acid deprived *relA* mutants of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **30**(10): 1239-1246.
- Vinella D., D'Ari R., Jaffe A. und Bouloc P.** (1992): Penicillin-binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. *Embo J* **11**(4): 1493-1501.
- Vinella D., Joseleau-Petit D., Thevenet D., Bouloc P. und D'Ari R.** (1993): Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression. *J Bacteriol* **175**(20): 6704-6710.
- Vollmer W.** (2007a): Preparation and analysis of pneumococcal murein (peptidoglycan). In Molecular biology of streptococci. Hakenbeck, R. und Chhatwal, S. (Hrsg.). Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. 531-535.
- Vollmer W.** (2007b): Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. In Molecular biology of streptococci. Hakenbeck, R. und Chhatwal, S. (Hrsg.). Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. 83-117.
- Vollmer W.** (2008): Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 287-306.
- Volz C.** (2008): Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie Piperacillin-resistenter Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Wagner C.** (2001): Two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Biocenter Basel, Switzerland.
- Warth A. D. und Strominger J. L.** (1972): Structure of the peptidoglycan from spores of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **11**(8): 1389-1396.
- Waxman D. J. und Strominger J. L.** (1983): Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* **52**: 825-869.
- Weber B., Ehlert K., Diehl A., Reichmann P., Labischinski H. und Hakenbeck R.** (2000): The *fib* locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett* **188**(1): 81-85.
- Wecke J., Madela K. und Fischer W.** (1997): The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 2953-2960.
- Ween O., Gaustad P. und 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.
- Weidenmaier C., Kokai-Kun J. F., Kristian S. A., Chanturiya T., Kalbacher H., Gross M., Nicholson G., Neumeister B., Mond J. J. und Peschel A.** (2004): Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* **10**(3): 243-245.
- Weiss D. S., Chen J. C., Ghigo J. M., Boyd D. und Beckwith J.** (1999): Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol* **181**(2): 508-520.

- Weiss D. S., Pogliano K., Carson M., Guzman L. M., Fraipont C., Nguyen-Disteche M., Losick R. und Beckwith J.** (1997): Localization of the *Escherichia coli* cell division protein FtsI (PBP3) to the division site and cell pole. *Mol Microbiol* **25**(4): 671-681.
- Weng M., Nagy P. L. und Zalkin H.** (1995): Identification of the *Bacillus subtilis pur* operon repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7455-7459.
- Weng M. und Zalkin H.** (2000): Mutations in the *Bacillus subtilis* purine repressor that perturb PRPP effector function *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* **41**(1): 56-59.
- White B.** (1938): The biology of pneumococcus. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- WHO** (2007): Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - World Health Organization position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **82**: 93-104.
- Xuan J., Zalkin H. und Weng M.** (2005): Mutations in PurBox1 of the *Bacillus subtilis pur* operon control site affect adenine-regulated expression *in vivo*. *Sci China C Life Sci* **48**(2): 133-138.
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Lin D. M., Peng V., Ngai J. und Speed T. P.** (2002): Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**(4): e15.
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P. und Speed T. P.** (2001): Normalization for cDNA microarray data. In *Microarrays: optical technologies and informatics*. Bittner, M., Chen, Y., Dorsel, A. und Dougherty, E. R. (Hrsg.), San Jose, CA, USA.
- Yeats C., Finn R. D. und Bateman A.** (2002): The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**(9): 438.
- Yoshida K. I., Fujita Y. und Ehrlich S. D.** (2000): An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**(19): 5454-5461.
- Yother J. und White J. M.** (1994): Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* **176**(10): 2976-2985.
- Zähler D.** (1999): Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-Systems *cia* von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Zähler D., Grebe T., Guenzi E., Krauß J., van der Linden M., Terhune K., Stock J. B. und Hakenbeck R.** (1996): Resistance determinants for β -lactam antibiotics in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are involved in genetic competence. *Microb Drug Resist* **2**(2): 187-191.
- Zähler D., Kaminski K., van der Linden M., Mascher T., Meral M. und Hakenbeck R.** (2002): The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3): 211-216.
- Zapun A., Vernet T. und Pinho M. G.** (2008): The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 345-360.
- Zerfaß I.** (2005): Die Rolle von PBP1a bei der Entwicklung von β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Zhang J. R., Idanpaan-Heikkila I., Fischer W. und Tuomanen E. I.** (1999): Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol* **31**(5): 1477-1488.
- Zhao G., Meier T. I., Kahl S. D., Gee K. R. und Blaszczyk L. C.** (1999): BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1124-1128.
- Zhao G., Yeh W. K., Carnahan R. H., Flokowitsch J., Meier T. I., Alborn W. E., Jr., Becker G. W. und Jaskunas S. R.** (1997): Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to β -lactam antibiotics. *J Bacteriol* **179**(15): 4901-4908.

7 Anhang

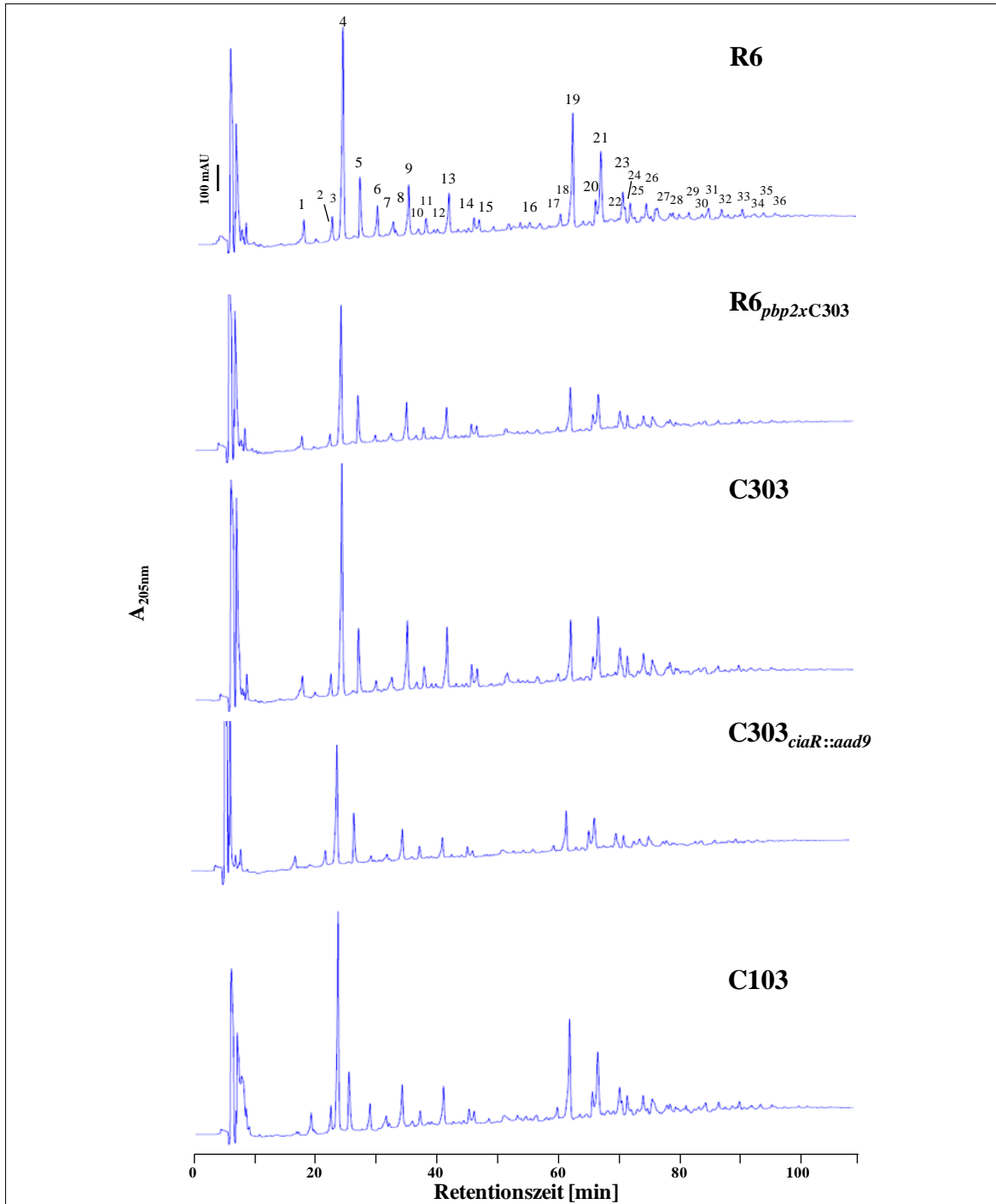


Abb. 7.1: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein. Gezeigt ist das Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) von R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein. 1 l-Kulturen in C-Medium wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 wachsen gelassen, die gewonnene Zellwand mit Fluorwasserstoffsäure und Mutanolysin behandelt und die freigesetzten Muropeptide mittels Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die Detektion der eluierten Muropeptide erfolgte über die Messung der UV-Absorption bei 205 nm. Die Eluate sind als Peaks gegen die Retentionszeit aufgetragen. Diese sind entsprechend ihrer Reihenfolge während der Elution nummeriert, wobei in Abb. 7.3 den Nummern Strukturen zugeordnet sind. Die Generierung eines HPLC-Elutionsprofils in Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid war nicht möglich. Zu beachten gilt ferner, dass eine Auftrennung von Peak 2 und 3, sowie 17 und 18 nicht erzielt werden konnte. Abk.: mAU (milli Absorbance Units)

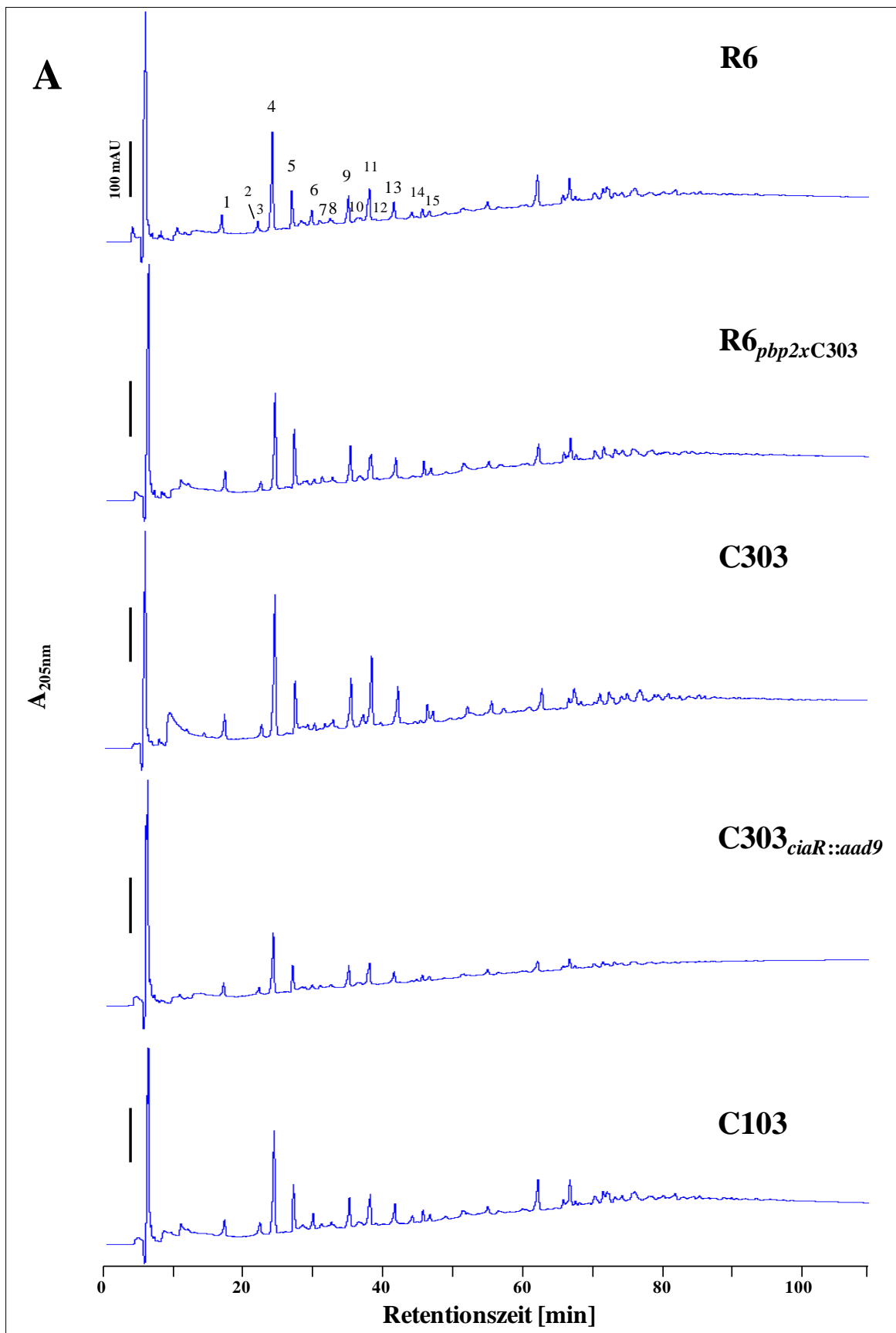


Abb. 7.2: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid.

Legende siehe nächste Seite.

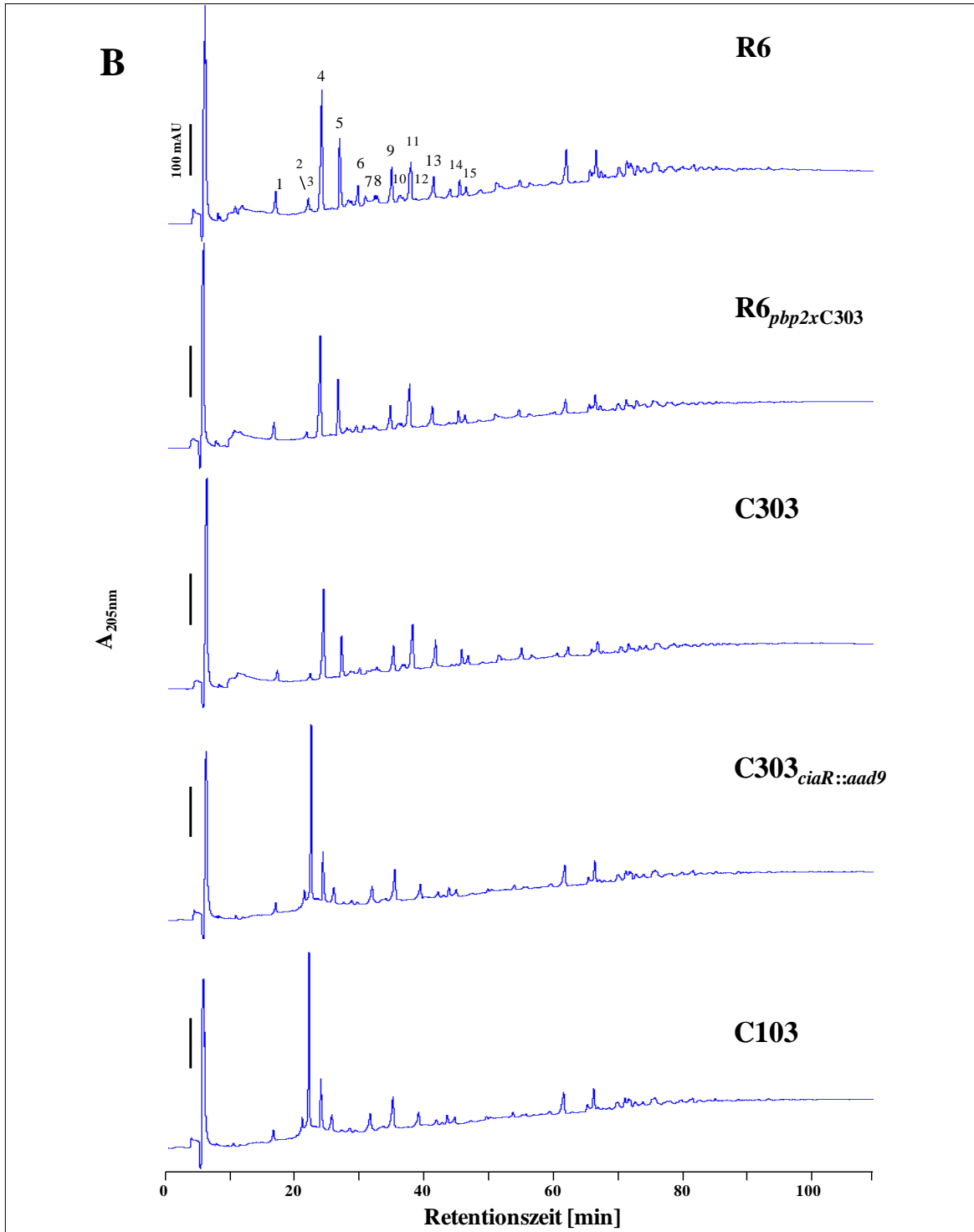


Abb. 7.2: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid.

Gezeigt ist das Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) von R6, C103, C303, C303_{*ciaR::aad9*} und R6_{*pbp2xC303*} für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 2 % Cholinchlorid. 1 l-Kulturen in C-Medium mit bzw. ohne 2 % Cholinchlorid wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 wachsen gelassen, die gewonnene Zellwand mit Mutanolysin verdaut und die freigesetzten Muropeptide mittels Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die Detektion der eluierten Muropeptide erfolgte über die Messung der UV-Absorption bei 205 nm. Die Eluate sind als Peaks gegen die Retentionszeit aufgetragen. Diese sind entsprechend ihrer Reihenfolge während der Elution nummeriert, wobei in Abb. 7.3 den Nummern Strukturen zugeordnet sind. Eine Quantifizierung der Dimere und Trimere war nicht möglich. Zudem konnten Peak 2 und 3 nicht getrennt dargestellt werden.

1	2	3	4	5	6		7	8
G-M-G-M	G-M L-Ala D-iGlu L-Lys	G*-M L-Ala D-iGlu L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G*-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala	OR G-M L-Ala D-iGln L-Lys D-Ala	G-M L-Ala D-iGlu L-Lys-L-Ser-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys D-Ala Gly
	Tri[Glu]	Tri[Glu/deAc]	Tri	Tri[deAc]	Tri(A)	Tetra	Tri(SA)[Glu]	Penta[Gly]
9	10		11	12	13	14	15	
G-M L-Ala D-iGln L-Lys D-Ala D-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser	G-M(OAc) L-Ala D-iGln L-Lys	G*-M L-Ala D-iGlu L-Lys-L-Ser-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala D-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala	G*-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala	
Penta	Tri(S)	Tri[OAc]	Tri(SA)[Glu/deAc]	Tetra(A)	Tri(SA)	Tri(SA)[deAc]	Tri(AA)	
16	17		18	19	20	21		
G-M L-Ala D-iGlu L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala	
TetraTri[Glu] [‡]	TetraTri[Glu/deAc] [‡]		TetraTri[-G] [‡]	TetraTri	TetraTri[deAc] [‡]	Tetra(SA)Tri		
22	23			24	25			
M L-Ala D-iGlu L-Lys-L-Ala-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala	G*-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	Ac G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala	
TetraTri(AA) [‡] [Glu/-G] [‡]	Tetra(AA)Tri			TetraTri(SA)	Tetra(SA)Tri[deAc] [‡]	TetraTri[OAc] [‡]		
26				27				
G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala	G*-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ala-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	G*-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala	G-M L-Ala D-iGln L-Lys	
Tetra(SA)Tri(SA)		TetraTri(AA) [‡] (SA) [‡]		TetraTri(AA) [‡] [deAc] [‡]		TetraTri(SA) [‡] [deAc] [‡]		

Abb. 7.3: Strukturen der in der Zellwand von R6, C103, C303, C303^{ciaR::aad9} und R6^{pbp2x}C303 de-
tektierten Muropeptide.

Legende siehe übernächste Seite.

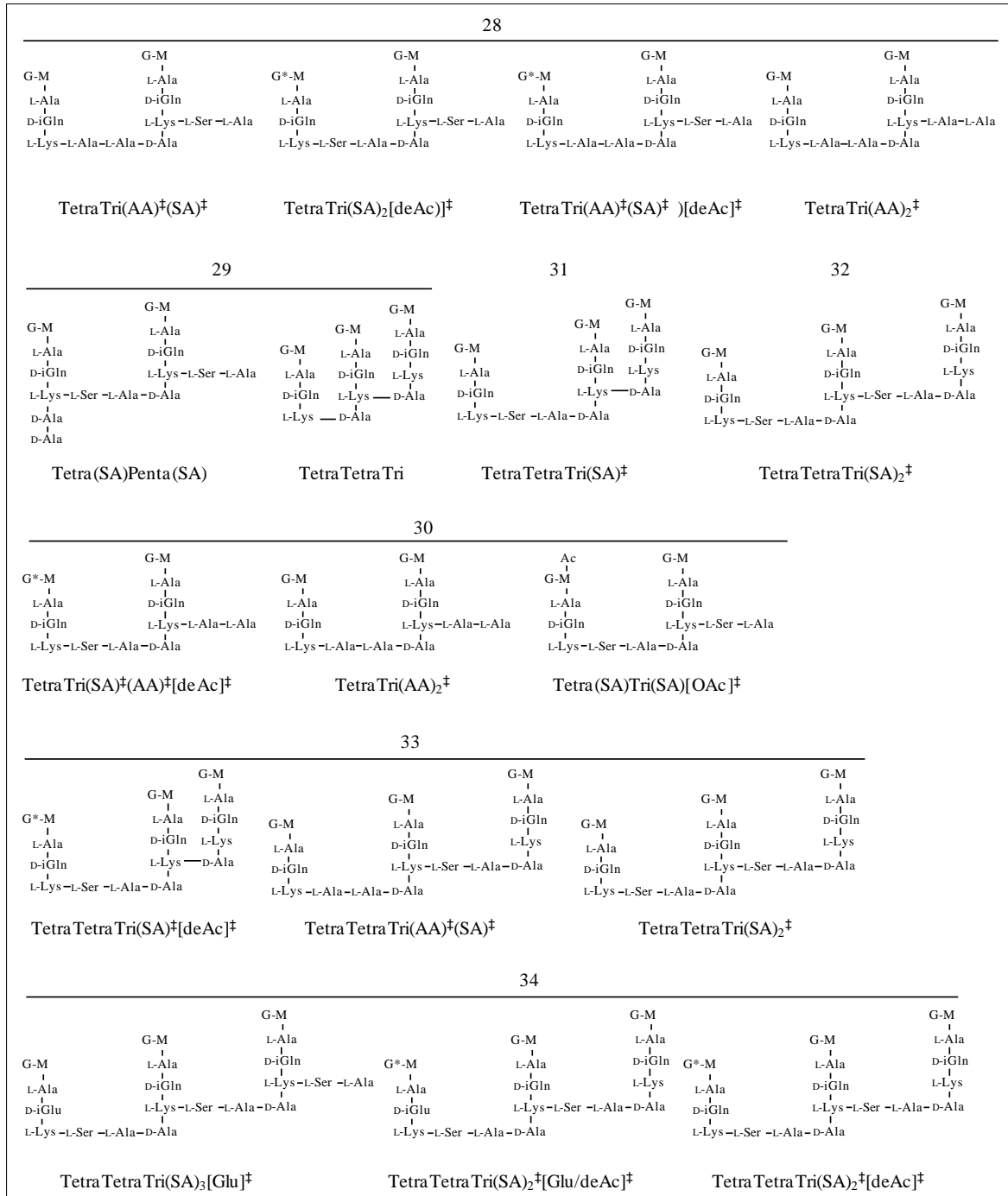


Abb. 7.3: Strukturen der in der Zellwand von R6, C103, C303, C303^{*ciaR::aad9*} und R6^{*bbp2xC303*} de-
tektierten Muropeptide.

Legende siehe nächste Seite.

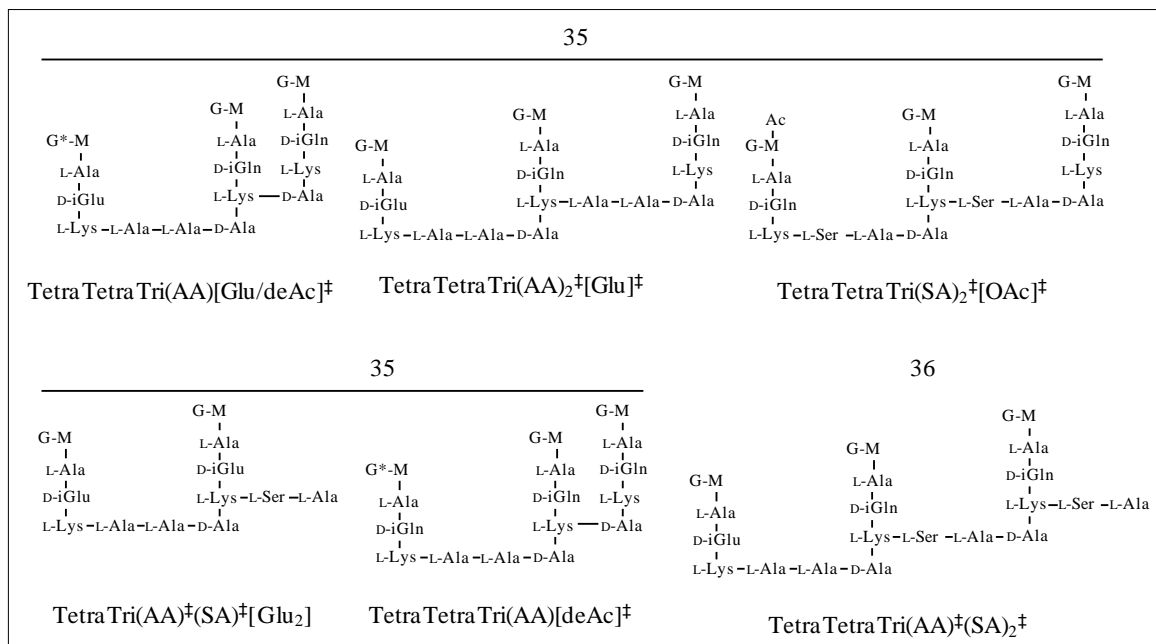


Abb. 7.3: Strukturen der in der Zellwand von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} detektierten Muropeptide.

Aufgelistet sind die Strukturen aller in der Zellwand von R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} mittels LTQ-FT-Massenspektrometrie detektierten reduzierten Muropeptide. Die Zahlen über den Strukturen geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern) (siehe Abb. 7.1 und Abb. 7.2). Die Bezeichnungen der Muropeptide befinden sich jeweils unterhalb der entsprechenden Struktur. Bei einigen Eluatens sind mehrere Strukturen denkbar; diese sind alle unter der betreffenden Zahl aufgeführt. Bei den Strukturen 4, 9, 13, 19, 21, 23, 26 (linke Struktur), 31 und 32 handelt es sich um Haupt-Muropeptide der Pneumokokken-Zellwand. Es ist anzumerken, dass sowohl Glutamat als auch Glutamin an Position 2 der Stammpeptide auftritt, in der „fertigen“, vernetzten Pneumokokken-Zellwand aber ausschließlich letztere Aminosäure anzutreffen ist. Darüber hinaus sind strukturelle Modifikationen in den Glykansträngen zu beobachten. So sind einige der N-Acetylglukosamin-Reste durch das Enzym PgdA zu Glukosamin deacetyliert, was durch einen Stern in der betreffenden Struktur bzw. durch die Abkürzung deAc in der Bezeichnung angedeutet ist. Außerdem ist eine O-Acetylierung der N-Acetylmuraminsäure-Reste durch das Enzym Adr zu verzeichnen, was durch die Abkürzung OAc gekennzeichnet ist. Die Buchstaben A, AA und SA in den Strukturbezeichnungen weisen auf die Zusammensetzung der Interpeptidbrücken hin.

Abk.: A, AA (Alanin, Alanin-Alanin), deAc (deacetyliert), G (N-Acetylglukosamin), M (N-Acetylmuraminsäure), OAc (O-acetyliert), Penta (Pentapeptid), SA (Serin-Alanin), Tri (Tripeptid), Tetra (Tetrapeptid)

Tab. 7.1: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial.

In der Tabelle ist für die untersuchten Stämme R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} jeweils die relative Fläche der einzelnen Peaks an der Gesamtpeakfläche (= relativer Anteil der detektierten Muropeptide am Gesamtpeptidmaterial) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein aufgezeigt. Die Zahlen auf der linken Seite geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern) (siehe Abb. 7.1). In der letzten Zeile ist die Menge des wiedergewonnenen Gesamtpeptidmaterials aufgeführt. Anzumerken ist, dass eine Auftrennung von Peak 2 und 3, sowie 17 und 18 nicht möglich war.

Peak Nr.	Peakfläche [%]				
	R6	R6 _{pbp2xC303}	C303	C303 _{ciaR::aad9}	C103
1	1,68	1,85	1,82	2,51	0,14
2/3	1,55	1,57	1,69	2,38	1,91
4	15,08	19,52	19,94	18,22	15,69
5	4,12	6,10	5,39	6,96	4,98
6	2,25	0,82	1,10	0,84	2,27
7	1,44	1,57	1,86	1,33	1,52
8	0,38	0,23	0,20	0,29	0,33
9	3,86	5,40	6,07	4,88	3,44
10	0,69	0,50	0,82	0,42	0,52
11	1,38	1,64	2,14	1,96	1,06
12	0,39	0,28	0,38	0,37	0,29
13	3,25	4,83	5,39	3,40	3,32
14	1,01	1,74	1,63	1,44	1,09
15	0,96	1,76	1,60	1,03	1,00
16	0,63	0,11	0,15	0,29	0,60
17/18	1,42	0,95	0,98	1,18	1,30
19	9,01	7,25	5,52	7,22	8,68
20	1,82	2,38	1,88	3,05	1,99
21	6,82	6,72	6,38	6,64	6,56
22	0,82	0,77	0,48	0,64	0,63
23	2,89	3,17	3,15	3,26	2,94
24	0,93	0,69	0,65	0,00	0,94
25	1,89	1,90	1,77	1,82	1,96
26	2,18	2,47	2,56	2,25	2,33
27	1,82	2,37	1,28	2,99	2,93
28	1,27	1,13	1,05	1,05	1,32
29	1,66	0,22	0,23	0,18	0,32
30	0,39	0,37	0,40	1,25	0,43

Peak Nr.	Peakfläche [%]				
	R6	R6 _{pbp2xC303}	C303	C303 _{ciaR::aad9}	C103
31	1,59	1,24	1,04	1,16	1,50
32	1,24	0,98	0,60	1,16	1,29
33	0,80	0,62	0,60	0,98	0,85
34	0,88	0,61	0,70	0,76	0,96
35	0,81	0,42	0,50	0,71	0,99
36	0,80	0,25	0,40	0,52	0,71
Summe	77,73	82,46	80,35	83,14	76,78

Tab. 7.2: Relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit von 2 % Cholinchlorid am Gesamt-Monomerpeptidmaterial.

In der Tabelle ist für die Stämme R6, C103, C303, C303_{ciaR::aad9} und R6_{pbp2xC303} die relative Fläche der einzelnen Peaks an der Gesamtpeakfläche (relativer Anteil der detektierten monomeren Muropeptide am Gesamt-Monomerpeptidmaterial in Prozent) für die Analyse der Muropeptide aus der Zellwand in Ab- und Anwesenheit (rot markierte Zahlen) von 2 % Cholinchlorid aufgezeigt. Die Zahlen auf der linken Seite geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern) (siehe Abb. 7.2). In der letzten Zeile ist die Menge des wiedergewonnenen Gesamt-Monomerpeptidmaterials aufgeführt. Eine Quantifizierung der Dimere und Trimere war nicht möglich. Anzumerken ist ferner, dass eine Auftrennung von Peak 2 und 3 nicht erzielt werden konnte.

Peak Nr.	Peakfläche (Peak 1-15) [%]									
	R6	R6 _{pbp2xC303}	C303	C303 _{ciaR::aad9}	C103					
1	2,84	2,12	2,91	2,53	2,35	1,70	2,68	3,24	2,43	1,70
2/3	1,76	1,41	1,49	0,95	1,30	1,09	2,09	1,87	2,05	3,54
4	15,37	11,18	14,26	15,12	13,48	14,93	13,70	15,12	14,29	20,32
5	5,17	6,08	8,05	7,74	4,63	6,02	4,97	8,24	5,58	7,23
6	2,32	2,03	0,74	1,37	0,87	1,35	1,17	0,69	2,20	2,85
7	0,56	1,20	0,82	1,00	0,75	0,52	1,05	1,19	1,03	0,33
8	0,74	1,02	0,74	0,91	1,48	1,13	1,25	0,71	1,50	0,76
9	4,51	3,51	5,82	3,84	4,89	4,59	4,92	3,01	4,33	3,80
10	1,14	0,95	1,47	1,31	1,67	1,34	1,43	1,76	1,17	1,32
11	6,30	4,89	5,83	8,61	7,23	9,48	6,47	6,64	5,49	6,28
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00
13	3,04	2,25	3,59	3,27	4,00	5,02	2,97	5,43	3,12	2,77
14	1,19	1,30	2,08	1,72	1,62	2,39	1,08	3,51	1,43	1,47
15	0,99	0,88	1,37	1,37	1,03	1,79	0,99	2,01	1,03	1,41
Summe Monomere	45,92	38,82	49,18	49,74	45,59	51,33	44,75	53,65	45,67	53,80

Tab. 7.3: Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338G}- und R6_{pbp2x2349}-Mutante bei einer Zelldichte von N=40.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche der R6_{pbp2xT338G}- bzw. R6_{pbp2x2349}-Mutante mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis (AVG ≥ 2 oder $\leq 0,5$) zu R6, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von R6 an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 2 oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 3 oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2xT338G}	R6 _{pbp2x2349}
2349.2x						44,65
	AE005672_2024264	SP2110 ... SP2111			0,47	
	AE005672_2101744	SP2183 ... SP2184			0,37	0,50
	AE005672_45209	SP0044 ... SP0045			3,87	2,91
	AE005672_512951	SP0533 ... SP0534				0,45
AE007317_113125		spr0104 ... spr0105				2,06
AE007317_150363		spr0140 ... spr0141			2,09	
AE007317_22405		spr0020 ... spr0021				0,41
AE007317_288340		spr0286 ... spr0287			0,47	
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031				0,50
AE007317_386658		spr0388 ... spr0389				0,50
AE007317_387127		spr0389 ... spr0390				0,48
AE007317_39745		spr0040 ... spr0041				0,48
AE007317_400958		spr0404 ... spr0405			3,13	2,98
AE007317_403039		spr0406 ... spr0407			3,02	2,34
AE007317_450280		spr0444 ... spr0445			2,55	
AE007317_500572		spr0503 ... spr0504			0,48	
AE007317_562193		spr0560 ... spr0561				2,05
AE007317_56907		spr0052 ... spr0053			2,90	2,23
■ spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16		0,48
-	SP0040		-	Hypothetical protein		0,34
-	SP0052		-	Hypothetical protein	3,25	2,62

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2xT338G}	R6 _{pbp2x2349}
spr1214	SP0174	-	-	Putative chlorohydrolase	2,27	
spr0040	SP0533		<i>blpK</i>	bacteriocin BlpK		0,21
spr0040	SP0541		<i>blpO</i>	bacteriocin BlpO		0,39
-	SP1183		-	Putative tagatose 1,6-diphosphate aldolase	0,35	
-	SP1678		-	Hypothetical protein	0,48	
-	SP1892		-	Hypothetical protein		0,49
-	SP2049		-	Putative pseudopilin PulG (Type II secretory pathway)		0,45
-	SP2140		-	Hypothetical protein	5,57	
spr0020	SP0018		-	Putative recombination regulator RecX		0,35
spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16		0,44
spr0031	SP0031		-	Putative ribose-phosphate pyrophosphokinase		0,47
spr0040	SP0041		<i>thmA</i>	Amphipathic pore-forming peptide precursor		0,19
spr0043	SP0042		<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA		0,28
spr0044	SP0043		<i>comB</i>	Transport protein ComB		0,34
spr0045	SP0044		<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase	8,18	2,73
spr0046	SP0045		<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase	2,78	2,83
spr0047	SP0046		<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase	4,33	3,89
spr0048	SP0047		<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazole synthetase	3,79	2,64
spr0049	SP0048		<i>purN</i>	5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1	3,14	2,61
spr0050	SP0049		<i>vanZ</i>	Teicoplanin resistance protein/Putative bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide-formyltransferase (IMP cyclohydrolase)	2,68	2,66
spr0051	SP0050		<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase		2,20
spr0052	SP0051		<i>purD</i>	Phosphoribosylglycinamide synthetase	5,49	3,28
spr0053	SP0053		<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	2,90	
spr0054	SP0054		<i>purK</i>	Phosphoribosyl glucinamide formyltransferase	2,99	3,01
spr0083	SP0092		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter solute binding protein - sugar transport	0,30	
spr0105	SP0042		<i>Transporter-truncation</i>	Transporter, truncation		2,09
spr0141	SP0142		-	Hypothetical protein	2,00	
spr0142	SP0143		-	Putative CAAX amino protease family protein	2,01	
spr0157	SP0159		-	Putative Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the Nramp family		2,03
spr0161	SP0175		<i>ribE</i>	Riboflavin synthase beta chain	2,50	
spr0162	SP0176		<i>ribA</i>	Riboflavin biosynthesis; GTP-cyclohydrolase II.	2,52	
spr0163	SP0177		<i>ribC</i>	Riboflavin synthase alpha-chain	2,45	
spr0164	SP0178		<i>ribD</i>	Riboflavin biosynthese; a deaminase	2,10	
spr0264	SP0287		-	Putative xanthine/uracil permease family protein	4,05	3,16
spr0265	SP0288		-	Putative CAAX amino protease family protein	2,05	
spr0388	SP0429		-	Hypothetical protein		0,47
spr0401	SP0445		<i>ihvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	3,19	2,34

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2x1338G}	R6 _{pbp2x2349}
spr0402	SP0446		<i>ihvN</i>	Acetolactate synthase small subunit	3,11	2,72
spr0403	SP0447		<i>ihvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	3,68	3,27
spr0404	SP0448		-	Putative threonine dehydratase	3,16	3,00
spr0405	SP0449		-	Putative ketol-acid reductoisomerase	2,42	3,63
spr0406	SP0450		<i>ihvA</i>	Threonine desaminase	3,45	2,41
spr0443	SP0501		<i>glnR</i>	Transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	2,41	
spr0444	SP0502		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase type 1	2,16	
spr0445	SP0505		<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme		0,45
spr0446	SP0507		<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme <i>Eco</i> KI specificity protein (S protein)		3,46
spr0461	SP0524		<i>blpT</i>	Hypothetical protein		0,21
spr0462	SP0525		<i>blpS</i>	Regulatory protein		0,46
spr0463	SP0526		<i>rr13</i>	Response regulator		0,41
spr0464	SP0527		<i>hk13</i>	Histidine kinase		0,34
spr0465	SP0528		<i>ip</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type		0,19
spr0466	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter		0,15
spr0467	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter		0,17
spr0468	SP0042		<i>blpA</i>	Putative BlpC ABC transporter (ATP-binding protein BlpA)		0,16
spr0469	SP0042		<i>blpA</i>	SpiA protein		0,19
spr0470	SP0541		-	Putative bacteriocin BlpO		0,29
spr0471	-		-	Hypothetical protein		0,27
spr0472	SP0545		<i>blpY</i>	BlpY protein		0,20
spr0473	SP0546		<i>blpZ</i>	Putative BlpZ protein (fusion)		0,25
spr0474	SP0547		<i>pncP</i>	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate		0,08
spr0504	SP0576		<i>licT</i>	Transcriptional antiterminator (BglG family)	0,41	
spr0505	SP0577		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,38	
spr0506	SP0578		<i>bglH</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,40	
spr0565	SP0648		<i>bgaA</i>	beta-galactosidase precursor	0,43	
spr0602	SP0687		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - sodium transport	0,48	
spr0660	SP0750		<i>livH</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - branched chain amino acid transport	2,20	
spr0661	SP0751		<i>livM</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - branched chain amino acid transport	2,31	
spr0708	SP0799		<i>ciaH</i>	Sensor protein CiaH histide kinase	0,46	
spr0759	SP1527		<i>ABC-SBP-internal deletion</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptid transport, internal deletion	2,80	
spr0761	SP0859		-	Putative permease	2,19	
spr0782	SP0879		-	Putative membrane protein	0,43	
spr0785	SP0882		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase	2,35	
spr0786	SP0883		-	Putative esterase family protein	2,80	
spr0788	SP0884		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase	2,79	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2xT338G}	R6 _{pbp2x2349}
spr0789	SP0885	-	-	Putative carbamoylphosphate synthase (large subunit)	2,26	
spr0810	SP0910	-	-	Putative PspC domain family protein	0,43	
spr0818	SP0917	-	<i>transposase F</i>	Degenerate transposase	0,44	
spr0825	SP0924	-	-	Hypothetical protein		0,50
spr0852	-	-	<i>ald-truncation</i>	Alanine dehydrogenase, truncation	0,48	
spr0854	-	-	<i>ald-truncation</i>	Alanine dehydrogenase, truncation	0,48	
spr0856	SP0954	-	<i>celA</i>	Competence protein		0,33
spr0857	SP0955	-	<i>celB</i>	Competence protein		0,35
spr0866	SP0964	-	<i>pyrD</i>	Dihydroorotate dehydrogenase	2,23	
spr0881	SP0978	-	<i>coiA</i>	Competence protein		0,37
spr0914	SP1009	-	<i>hemH</i>	Ferrochelataze	0,44	
spr0931	SP1027	-	-	Putative exported protein	0,43	
spr0996	SP1088	-	<i>radC</i>	DNA repair protein		0,35
spr1030	SP1122	-	<i>glgC</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0,42	
spr1031	SP1123	-	<i>glgD</i>	Required for glycogen biosynthesis	0,42	
spr1032	SP1124	-	<i>glgA</i>	Glycogen synthase	0,42	
spr1060	SP1174	-	<i>phpA</i>	Histidine Motif-Containing protein	13,79	
spr1069	SP1184	-	<i>lacG</i>	Phospho-beta-D-galactosidase	0,37	
spr1070	SP1185	-	<i>lacE</i>	PTS system, lactose-specific IIBC component	0,49	
spr1071	SP1186	-	<i>lacF</i>	PTS system, lactose-specific IIA component	0,50	
spr1097	SP1215	-	<i>nirC</i>	Formate-nitrate transporter	0,50	
spr1109	SP1229	-	<i>fhs</i>	Formate-tetrahydrofolate ligase	2,37	
spr1143	SP1265	-	-	Hypothetical protein	0,37	
spr1144	SP1266	-	<i>smf</i>	DNA processing Smf protein		0,47
spr1153	SP1275	-	<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit	2,80	
spr1154	SP1276	-	<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit	2,04	
spr1155	SP1277	-	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase	2,17	
spr1378	SP1839	-	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	2,60	
spr1379	SP1839	-	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	2,65	
spr1380	SP1840	-	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	3,46	
spr1381	-	-	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	3,25	
spr1382	SP1527	-	<i>aliB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	3,26	
spr1519	SP1675	-	<i>glk</i>	Glucokinase	0,48	
spr1520	SP1676	-	<i>npl-truncation</i>	N-acetylneuraminate lyase subunit, truncation	0,47	
spr1522	SP1677	-	-	Putative membrane protein	0,48	
spr1523	SP1679	-	-	Putative membrane protein	0,47	
spr1524	SP1680	-	-	Conserved hypothetical protein	0,47	



























Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2xT338G}	R6 _{pbp2x2349}
	spr1525	SP1681	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport	0,44	
	spr1527	SP1683	<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - sugar transport	0,41	
	spr1538	SP1695	<i>axe1</i>	Xylan esterase 1	0,45	
	spr1561	SP1716	<i>natB</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Na+ export		0,45
	spr1628	SP1808	<i>piID</i>	Type 4 prepilin peptidase		0,44
	spr1641	SP1823	<i>mgtC</i>	Mg(2+) transport ATPase/permease	0,24	
	spr1642	-	-	Hypothetical protein	0,45	
	spr1643	SP1824	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate	0,38	
	spr1644	SP1825	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,44	
	spr1645	SP1826	<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate	0,39	
	spr1646	SP1827	-	Hypothetical protein	0,40	
	spr1662	SP1847	<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosyltransferase	3,10	2,37
	spr1663	SP1848	<i>pbuX</i>	Nucleobase:cation symporter for xanthine	3,44	2,44
	spr1687	SP1872	<i>fatB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - ferric iron transport		2,49
	spr1698	SP1883	<i>dexS</i>	Dextran glucosidase	0,36	
	spr1699	SP1884	<i>treP</i>	Phosphotransferase system, trehalose-specific IIBC component	0,25	
	spr1756	SP1939	<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein		0,44
	spr1757	SP1940	<i>recA</i>	DNA recombination/repair		0,47
	spr1758	SP1941	<i>cinA</i>	Competence induced protein		0,41
	spr1762	SP1945	-	Putative lipoprotein		0,47
	spr1801	SP1987	<i>ABC-NBD</i>	Putative ABC-type antimicrobial peptide transport system (ATPase component)	2,08	
	spr1802	SP1988	-	Putative immunity protein	2,31	
	spr1819	SP2006	<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator		0,33
	spr1837	SP2026	<i>adhE</i>	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	0,43	
	spr1858	SP2047	-	Putative exported protein		0,49
	spr1859	SP2048	-	Putative competence protein ComGF		0,43
	spr1861	SP2050	<i>cglD</i>	Competence protein		0,46
	spr1862	SP2051	<i>cglC</i>	Competence protein		0,44
	spr1863	SP2052	<i>cglB</i>	Competence protein		0,37
	spr1864	SP2053	<i>cglA</i>	Competence protein		0,41
	spr1875	SP0664	-	Putative LysM domain-containing protein	0,47	
	spr1895	SP2084	<i>pstS</i>	ABC transporter substrate-binding protein - phosphate transport	2,08	2,12
	spr1916	SP2106	<i>malP</i>	Maltodextrin phosphorylase	0,35	
	spr1917	SP2107	<i>malM</i>	4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase)	0,48	
	spr1920	SP2110	<i>malD</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin	0,43	
	spr1957	SP2150	<i>arcB</i>	Ornithine transcarbamoylase	0,49	
	spr1958	SP2151	<i>arcC</i>	Carbamate kinase	0,50	










Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					R6 _{pbp2xT338G}	R6 _{pbp2x2349}
spr1959	SP2152		-	Putative C4-dicarboxylate anaerobic carrier protein	0,50	
spr1960	SP2153		-	Putative peptidase family M20/M25/M40 protein	0,42	
spr1965	SP2159		-	Putative fuclectin-related protein	0,50	
spr1966	SP2160		-	Putative large secreted protein	0,47	
spr1967	SP2161		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,37	
spr1968	SP2162		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,43	
spr1969	SP2163		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,41	
spr1970	SP2164		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,45	
spr1987	SP2183		-	ORF3	0,18	0,15
spr1988	SP2184		<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	0,17	0,05
spr1989	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,21	0,08
spr1990	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,18	0,06
spr1991	SP2186		<i>glpK</i>	Glycerol kinase		0,06
spr2006	SP2201		<i>cbpD</i>	Choline binding protein D		0,43
spr2012	SP2207		<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)		0,42
spr2013	SP2208		<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases		0,35
spr2042	SP2236		<i>comD</i>	Histidine protein kinase		0,44
spr2043	SP2237		<i>comC</i>	Competence stimulating peptide precursor (CSP)		0,35
spr2046	SP2240		<i>spo0J</i>	Chromosome segregation protein	0,41	

Tab. 7.4: Das Transkriptom der R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}- und R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante bei einer Zelldichte von N=40 im Vergleich.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche der R6_{pbp2x2349pbp1a2349}-Transformante mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis (AVG ≥ 2 oder $\leq 0,5$) zu R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349}, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von R6_{pbp2xT338Gpbp1a2349} an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 2 oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 3 oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis	
					R6 _{pbp2x2349pbp1a2349}	R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349}
2349.2x						41,36
	AE005672_106519	SP0103 ... SP0104				4,66
	AE005672_127537	SP0123 ... SP0124				6,43
	AE005672_1393488	SP1479 ... SP1480				2,28
	AE005672_1501002	SP1596 ... SP1597				2,22
	AE005672_1724126	SP1810 ... SP1811				4,72
	AE005672_1843103	SP1939 ... SP1940				3,26
	AE005672_31244	SP0031 ... SP0032				4,00
	AE005672_45209	SP0044 ... SP0045				2,53
AE007317_1076753		spr1081 ... spr1082				2,12
AE007317_113125		spr0104 ... spr0105				5,00
AE007317_1166915		spr1164 ... spr1165				2,18
AE007317_150363		spr0140 ... spr0141				0,34
AE007317_1604241		spr1630 ... spr1631				3,28
AE007317_1723154		spr1755 ... spr1756				3,80
AE007317_1998757		spr2005 ... spr2006				6,38
AE007317_22405		spr0020 ... spr0021				5,81
AE007317_281043		spr0282 ... spr0283				0,48
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031				6,35
AE007317_386658		spr0388 ... spr0389				6,02
AE007317_387127		spr0389 ... spr0390				4,66
AE007317_400958		spr0404 ... spr0405				0,43

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis	
					R6 _{pbp2x2349pbp1a2349} /R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349}	
AE007317_403039		spr0406 ... spr0407				0,44
AE007317_568853		spr0561 ... spr0562				0,24
 spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16		21,51
-	SP0094		-	Hypothetical protein		9,49
 -	SP0123		<i>ccsI</i>	competence-induced protein Ccs1		9,07
-	SP0126		-	Hypothetical protein		3,61
 spr0182	SP0200		<i>ccs4</i>	competence-induced protein Ccs4		3,85
 spr0279	SP0307		-	PTS system, IIA component		0,11
 spr0600	SP0685		-	Putative bacteriocin (lactococcin 972 family)		2,08
 spr1080	SP1197		-	Putative PTS system (galactose-specific IIB component)		2,24
spr1143	SP1265		-	Hypothetical protein		4,36
spr0031	SP1481		-	Putative glycyl-tRNA synthetase subunit alpha		3,18
spr1545	SP1703		-	Putative GTP-binding protein EngA		0,43
-	SP1892		-	Hypothetical protein		3,23
-	SP1929		-	Hypothetical protein		2,17
-	SP1938		-	Hypothetical protein		3,20
 -	SP2049		-	Putative pseudopilin PuIG (Type II secretory pathway)		21,62
-	SP2140		-	Hypothetical protein		0,11
 spr0020	SP0018		-	Putative recombination regulator RecX		18,62
 spr0021	SP0019		<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase		3,15
 spr0023	SP0021		<i>dut</i>	Deoxyuridinetriphosphatase		3,35
 spr0024	SP0022		-	Putative phosphoglycerate mutase family protein		3,43
 spr0025	-		<i>radA</i>	DNA repair: sensitivity to gamma and UV radiation		4,79
 spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16		19,57
 spr0031	SP0031		-	Putative ribose-phosphate pyrophosphokinase		7,39
 spr0043	SP0042		<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA		18,37
 spr0044	SP0043		<i>comB</i>	Transport protein ComB		20,80
 spr0045	SP0044		<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase		3,97
 spr0046	SP0045		<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase		2,45
 spr0047	SP0046		<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase		2,36
 spr0048	SP0047		<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazole synthetase		2,90
 spr0049	SP0048		<i>purN</i>	5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1		2,08
 spr0052	SP0051		<i>purD</i>	Phosphoribosylglycinamide synthetase		2,01
 spr0059	SP0060		<i>bgaC</i>	Beta-galactosidase 3		2,25
 spr0101	SP0112		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter solute-binding protein - amino acid transport		0,30
 spr0102	-		<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase		0,43
 spr0103	SP0056		<i>argH</i>	Arginine succinate lyase		0,49

		Lage des intergenen Bereichs			Transkriptmengenverhältnis	
Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Genname	Funktion des Genprodukts	R6 _{pbp2x2349} /pbp1a2349/R6 _{pbp2xT338} Gbp1a2349		
	spr0105	SP0042	<i>Transporter-truncation</i>	Transporter, truncation	3,98	
	spr0106	SP0042	<i>Transporter-truncation</i>	Transporter, truncation	4,53	
	spr0107	-	-	Hypothetical protein	3,15	
	spr0108	SP0043	-	Putative secretion protein (HlyD family protein)	3,54	
	spr0109	SP0115	-	Putative argininosuccinate lyase	2,91	
	spr0127	SP0124	<i>cibB</i>	Competence-induced bacteriocin B	12,26	
	spr0128	SP0125	<i>cibA</i>	Competence-induced bacteriocin A	28,62	
	spr0141	SP0142	-	Hypothetical protein	0,29	
	spr0142	SP0143	-	Putative CAAX amino protease family protein	0,34	
	spr0143	SP0144	-	Putative CAAX amino protease family protein	0,37	
	spr0144	SP0145	-	Putative transporter, major facilitator family protein	0,36	
	spr0157	SP0159	-	Putative Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the Nramp family	0,29	
	spr0181	-	<i>orf47</i>	orf47	5,56	
	spr0182	SP0200	-	Putative competence-induced protein Ccs4	3,20	
	spr0276	SP0303	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,07	
	spr0277	SP0304	-	Putative 6-phospho-beta-glucosidase	0,06	
	spr0278	SP0305	<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,19	
	spr0279	SP0306	<i>bglG</i>	Transcription antiterminator BglG family	0,21	
	spr0280	SP0308	<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,11	
	spr0281	SP0309	-	Putative cellobiose phosphotransferase system IIA	0,10	
	spr0282	SP0310	<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,09	
	spr0304	SP0336	<i>pbpX</i>	Penicillin-binding protein 2X	0,45	
	spr0327	SP0366	<i>aliA</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	0,42	
	spr0388	SP0429	-	Hypothetical protein	4,24	
	spr0389	SP0430	-	Putative acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	5,09	
	spr0401	SP0445	<i>ihvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	0,35	
	spr0402	SP0446	<i>ihvN</i>	Acetolactate synthase small subunit	0,35	
	spr0403	SP0447	<i>ihvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	0,41	
	spr0404	SP0448	-	Putative threonine dehydratase	0,41	
	spr0405	SP0449	-	Putative ketol-acid reductoisomerase	0,47	
	spr0406	SP0450	<i>ihvA</i>	Threonine desaminase	0,47	
	spr0407	SP0451	-	Hypothetical protein	0,46	
	spr0465	SP0528	<i>ip</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type	2,19	
	spr0466	SP0529	<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	2,06	
	spr0471	-	-	Hypothetical protein	2,75	
	spr0472	SP0545	<i>blpY</i>	BlpY protein	2,47	
	spr0473	SP0546	<i>blpZ</i>	Putative BlpZ protein (fusion)	2,13	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis	
					R6 _{pbp2x2349} /pbp1a2349	R6 _{pbp2xT338} Gbp1a2349
spr0561	SP0641		<i>prtA</i>	Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA	0,21	
spr0562	SP0645		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	2,16	
spr0563	SP0646		-	Putative PTS system (IIB component)	2,19	
spr0614	SP0702		<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	2,25	
spr0661	SP0751		<i>livM</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - branched chain amino acid transport	0,48	
spr0674	SP0766		<i>sodA</i>	Manganese co-factored superoxide dismutase	2,03	
spr0690	SP0782		-	Putative cytosolic protein	7,20	
spr0691	SP0783		<i>bioY</i>	Biotin synthase	0,49	
spr0785	SP0882		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase	0,48	
spr0786	SP0883		-	Putative esterase family protein	0,33	
spr0788	SP0884		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase	0,34	
spr0789	SP0885		-	Putative carbamoylphosphate synthase (large subunit)	0,34	
spr0856	SP0954		<i>celA</i>	Competence protein	30,58	
spr0857	SP0955		<i>celB</i>	Competence protein	39,11	
spr0858	SP0956		-	Hypothetical protein	6,90	
spr0859	SP0957		-	Putative ABC transporter (ATP-binding protein)	7,30	
spr0860	SP0958		-	Putative ribosome recycling factor	8,86	
spr0866	SP0964		<i>pyrD</i>	Dihydroorotate dehydrogenase	2,12	
spr0881	SP0978		<i>coiA</i>	Competence protein	32,83	
spr0919	SP1014		<i>dapA</i>	Dihydrodipicolinate synthase	0,44	
spr0978	SP1072		<i>dnaG</i>	DNA primase	3,17	
spr0996	SP1088		<i>radC</i>	DNA repair protein	24,62	
spr1017	SP1110		<i>mreA</i>	Macrolide-efflux protein	3,55	
spr1028	SP1119		<i>gapN</i>	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,38	
spr1060	SP1174		<i>phpA</i>	Histidine Motif-Containing protein	0,06	
spr1080	SP1197		-	Putative PTS system (IIB component)	2,18	
spr1081	SP1198		-	Putative phosphotransferase system (sugar-specific EII component)	2,03	
spr1120	SP1241		<i>glnP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - glutamine transport	0,50	
spr1144	SP1266		<i>smf</i>	DNA processing Smf protein	43,10	
spr1153	SP1275		<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit	2,59	
spr1154	SP1276		<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit	2,12	
spr1155	SP1277		<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase	2,18	
spr1156	SP1278		<i>pyrR</i>	Transcriptional attenuation of the pyrimidine operon / uracil phosphoribosyltransferase activity	2,00	
spr1161	SP1282		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,48	
spr1165	SP1286		<i>pyrP</i>	Uracil permease	2,57	
spr1334	SP1480		-	Putative glycyl-t-RNA synthetase subunit alpha	2,99	
spr1452	-		-	Putative cytidylate kinase	6,22	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis	
					R6 _{ppb2x2349} /ppb1a2349	R6 _{ppb2xT338} Gpbp1a2349
spr1485	SP1643	-	-	Hypothetical protein	3,33	
spr1492	SP1648		<i>psaB</i>	ABC transporter ATP-binding protein - manganese transport	0,36	
spr1493	SP2170		<i>psaC</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - manganese transport	0,38	
spr1494	SP1650		<i>psaA</i>	ABC transporter substrate-binding protein - manganese transport.	0,39	
spr1549	-		-	Putative exported protein	2,00	
spr1558	SP1714		-	Putative GntR family transcriptional regulator	2,51	
spr1559	SP1715		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	2,52	
spr1560	SP1715		-	Putative ABC transporter (ATP-binding protein)	2,28	
spr1561	SP1716		<i>natB</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Na+ export	2,25	
spr1562	SP1717		<i>natA</i>	ABC transporter ATP-binding protein - Na+ export	2,09	
spr1628	SP1808		<i>pilD</i>	Type 4 prepilin peptidase	6,08	
spr1640	SP1822		-	Hypothetical protein	3,15	
spr1641	SP1823		<i>mgtC</i>	Mg(2+) transport ATPase/permease	6,04	
spr1642	-		-	Hypothetical protein	2,17	
spr1643	SP1824		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate	6,44	
spr1644	SP1825		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	7,03	
spr1645	SP1826		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate	8,70	
spr1646	SP1827		-	Hypothetical protein	7,97	
spr1647	SP1828		<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	4,94	
spr1648	SP1829		<i>galT</i>	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	4,33	
spr1649	SP1830		-	Putative phosphate transporter PhoU	5,08	
spr1650	SP1831		-	Hypothetical protein	4,58	
spr1651	SP1832		-	Hypothetical protein	4,98	
spr1652	SP1833		-	Putative cell wall surface anchor family protein	5,99	
spr1722	SP1906		<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	2,87	
spr1723	SP1907		<i>groES</i>	Cochaperonin GroES	3,09	
spr1724	SP1540		<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein	25,65	
spr1751	SP1935		-	Hypothetical protein	2,32	
spr1754	SP1937		<i>lytA</i>	Autolysin (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)	3,55	
spr1755	-		-	Hypothetical protein	3,54	
spr1756	SP1939		<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein	6,55	
spr1757	SP1940		<i>recA</i>	DNA recombination/repair	9,20	
spr1758	SP1941		<i>cinA</i>	Competence induced protein	10,73	
spr1762	SP1945		-	Putative lipoprotein	6,99	
spr1794	SP1980		<i>cbfI</i>	Cmp-binding-factor 1	2,15	
spr1795	SP1981		-	Putative competence-induced protein CcS50	2,26	
spr1819	SP2006		<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator	17,05	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis	
					R6 _{pbp2x2349pbp1a2349}	R6 _{pbp2xT338Gpbp1a2349}
	spr1829	SP2016	<i>nadC</i>	Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	3,91	
	spr1831	SP0111	-	Putative conserved domain protein	4,57	
	spr1856	-	-	Putative methyltransferase (small domain superfamily)	13,70	
	spr1857	-	-	Putative methyltransferase (small domain superfamily)	8,45	
	spr1858	SP2047	-	Putative exported protein	18,44	
	spr1859	SP2048	-	Putative competence protein ComGF	22,13	
	spr1861	SP2050	<i>cgID</i>	Competence protein	25,03	
	spr1862	SP2051	<i>cgIC</i>	Competence protein	25,17	
	spr1863	SP2052	<i>cgIB</i>	Competence protein	16,48	
	spr1864	SP2053	<i>cgIA</i>	Competence protein	26,44	
	spr1884	SP2072	<i>guaA</i>	Glutamine amidotransferase	0,49	
	spr1987	SP2183	-	ORF3	0,24	
	spr1988	SP2184	<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	0,11	
	spr1989	SP2185	<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,14	
	spr1990	SP2185	<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,11	
	spr1991	SP2186	<i>glpK</i>	Glycerol kinase	0,11	
	spr2006	SP2201	<i>cbpD</i>	Choline binding protein D	32,00	
	spr2011	SP2206	-	Putative ribosomal subunit interface protein	2,24	
	spr2012	SP2207	<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)	36,56	
	spr2013	SP2208	<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases	44,61	
	spr2041	SP2235	<i>comE</i>	Response regulator	4,57	
	spr2042	SP2236	<i>comD</i>	Histidine protein kinase	21,01	
	spr2043	SP2237	<i>comC</i>	Competence stimulating peptide precursor (CSP)	24,86	
	spr2045	SP2239	<i>sphtra</i>	Serine protease	2,27	
	spr2046	SP2240	<i>spoIJ</i>	Chromosome segregation protein	2,07	
	tRNA__Ala4				2,12	
	tRNA__Arg4				2,09	
	tRNA__Asn2				4,60	
	tRNA__Glu5				2,55	
	tRNA__Val3				2,21	

Tab. 7.5: Das Transkriptom der Mutantenfamilie C006 bei einer Zelldichte von N=40.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche von C106, C206, C306, C406, C506 und C606 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis (AVG ≥ 2 oder $\leq 0,5$) zu R6, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set ohne Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von R6 an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 2 oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 3 oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycerolipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
	AE005672_106519	SP0103 ... SP0104								0,42
	AE005672_1165415	SP1232 ... SP1233				0,48	0,49			
	AE005672_127537	SP0123 ... SP0124					0,45			
	AE005672_156000	SP0158 ... SP0159								2,02
	AE005672_1724126	SP1810 ... SP1811					0,40			
	AE005672_207835	SP0237 ... SP0238								0,43
	AE005672_31244	SP0031 ... SP0032					0,49			
	AE005672_45209	SP0044 ... SP0045				17,76	18,95	25,91	14,25	46,22
	AE005672_50671	SP0046 ... SP0047						5,93	6,17	4,20
	AE005672_512951	SP0533 ... SP0534				0,38	0,42			
	AE005672_669527	SP0702 ... SP0703								0,42
	AE005672_698007	SP0733 ... SP0734								2,27
AE007317_104786		spr0097 ... spr0098			0,49	0,49			0,37	
AE007317_108292		spr0100 ... spr0101							0,49	
AE007317_113125		spr0104 ... spr0105			0,44	0,18	0,19	0,25	0,29	0,18
AE007317_1431726		spr1447 ... spr1448							2,08	
AE007317_1503011		spr1526 ... spr1527								3,04
AE007317_1604241		spr1630 ... spr1631					0,49			
AE007317_1618842		spr1646 ... spr1647								2,70
AE007317_1634693		spr1661 ... spr1662				7,38	7,26	8,30	6,24	7,60
AE007317_1723154		spr1755 ... spr1756					0,48			
AE007317_1735558		spr1767 ... spr1768								23,24

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
AE007317_1743161		spr1774 ... spr1775								2,73
AE007317_195285		spr0186 ... spr0187								0,36
AE007317_1998757		spr2005 ... spr2006					0,44			
AE007317_2038404		spr2046 ... spr0001						0,46		
AE007317_22405		spr0020 ... spr0021					0,45			0,44
AE007317_233680		spr0239 ... spr0240						0,50		
AE007317_289280		spr0286 ... spr0287						0,42		
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031					0,48			
AE007317_305821		spr0306 ... spr0307								2,57
AE007317_386658		spr0388 ... spr0389								0,34
AE007317_387127		spr0389 ... spr0390								0,36
AE007317_39745		spr0040 ... spr0041				0,35	0,43			
AE007317_400958		spr0404 ... spr0405					2,10			
AE007317_500572		spr0503 ... spr0504								2,01
AE007317_56907		spr0052 ... spr0053				8,35	11,43	10,84	6,10	21,96
AE007317_918891		spr0932 ... spr0933						0,50		
spr0898	SP0015	-	-	IS630-Spn I, transposase Orf1						2,03
spr0030	SP0029	-	-	Putative competence-induced protein Ccs16			0,37			0,33
-	SP0040	-	-	Hypothetical protein		0,46	0,43			
-	SP0052	-	-	Hypothetical protein		13,60	17,16	13,14	7,71	27,72
-	SP0089	-	-	Hypothetical protein						2,71
spr0104	SP0114	-	-	Putative helix-turn-helix domain protein	0,25	0,32	0,30	0,36	0,31	0,24
-	SP0123	-	<i>ccsI</i>	competence-induced protein Ccs1						0,48
-	SP0203	-	-	Hypothetical protein						0,32
spr0186	SP0207	-	-	Putative phosphoribulokinase (Uridine kinase family)						0,40
spr0279	SP0307	-	-	PTS system, IIA component			0,44			2,04
-	SP0428	-	-	Hypothetical protein						0,50
spr0040	SP0533	-	<i>blpK</i>	bacteriocin BlpK		0,38				
-	SP1028	-	-	Hypothetical protein				0,44		
spr1143	SP1265	-	-	Hypothetical protein			0,48			
spr1360	SP1317	-	<i>mtpA</i>	v-type sodium ATP synthase, subunit A						2,25
spr1529	SP1330	-	<i>nanE</i>	N-acetylmannosamine-6-P epimerase, putative	2,34	2,00				2,39
-	SP1528	-	-	Hypothetical protein	4,43	3,64	3,41	3,02		4,19
spr0780	SP1618	-	-	PTS system, IIB component				0,45		
-	SP1696	-	-	Hypothetical protein				0,44		
-	SP1892	-	-	Hypothetical protein			0,49			
-	SP2049	-	-	Putative pseudopilin PulG (Type II secretory pathway)			0,44			0,12

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
spr0020	SP0018	-	-	Putative recombination regulator RecX			0,39			0,24
spr0030	SP0029	-	-	Putative competence-induced protein Ccs16			0,31			0,32
spr0031	SP0031	-	-	Putative ribose-phosphate pyrophosphokinase			0,43			
spr0040	SP0041	-	<i>thmA</i>	Amphipathic pore-forming peptide precursor		0,39	0,48			
spr0043	SP0042	-	<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA			0,38			0,21
spr0044	SP0043	-	<i>comB</i>	Transport protein ComB		0,40	0,30			0,20
spr0045	SP0044	-	<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase		16,75	20,30	22,85	8,00	49,00
spr0046	SP0045	-	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase		20,55	27,38	25,06	12,75	45,91
spr0047	SP0046	-	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase	2,14	57,12	55,51	45,14	14,95	71,58
spr0048	SP0047	-	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazole synthetase	2,26	57,90	69,53	47,61	35,16	71,34
spr0049	SP0048	-	<i>purN</i>	5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1	2,14	55,61	66,87	72,19	40,01	96,29
spr0050	SP0049	-	<i>vanZ</i>	Teicoplanin resistance protein/Putative IMP cyclohydrolase		39,68	32,55	46,08	48,76	52,26
spr0051	SP0050	-	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase		33,44	44,34	49,45	28,37	66,31
spr0052	SP0051	-	<i>purD</i>	Phosphoribosylglycinamide synthetase		15,92	17,60	17,65	8,56	48,52
spr0053	SP0053	-	<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit		25,22	26,77	22,20	10,54	41,65
spr0054	SP0054	-	<i>purK</i>	Phosphoribosyl glucinamide formyltransferase		25,38	21,44	30,16	19,03	48,48
spr0055	SP0055	-	-	Putative adenylosuccinate lyase		5,95	3,53	4,35	2,75	3,28
spr0056	SP0056	-	<i>purB</i>	Adenylosuccinate lyase		13,17	3,74	4,78	3,23	3,61
spr0059	SP0060	-	<i>bgac</i>	Beta-galactosidase 3		0,37	0,43	0,38	0,46	0,31
spr0067	-	-	-	Conserved hypothetical protein						2,05
spr0080	SP0088	-	-	Hypothetical protein						2,43
spr0081	SP0090	-	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport				0,42	0,46	0,37
spr0082	SP0091	-	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - sugar transport				0,46	0,48	0,48
spr0086	SP0097	-	-	Hypothetical protein						2,08
spr0089	SP0100	-	-	Putative transcriptional regulator PadR family						2,02
spr0096	SP0107	-	-	Putative LysM domain protein					0,50	2,02
spr0097	SP0114	-	-	Putative helix-turn-helix domain protein	0,29	0,29	0,24	0,29	0,28	0,23
spr0098	SP0109	-	-	Putative bacteriocin (lactococcin 972 family)	0,32	0,15	0,09	0,17		0,11
spr0099	SP0110	-	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - amino acid transport	0,16	0,04	0,05	0,09	0,16	0,03
spr0100	SP0111	-	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - amino acid transport		0,42	0,38	0,42		0,33
spr0101	SP0112	-	<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter solute-binding protein - amino acid transport	0,41	0,20	0,14	0,40	0,35	0,23
spr0102	-	-	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase		0,29	0,23	0,42		0,44
spr0103	SP0056	-	<i>argH</i>	Arginine succinate lyase		0,30	0,19	0,43	0,38	0,27
spr0104	SP0108	-	-	Putative helix-turn-helix domain protein	0,27	0,15	0,10	0,18	0,23	0,06
spr0106	SP0042	-	<i>Transporter-truncation</i>	Transporter, truncation	0,47	0,40	0,29	0,42	0,43	0,32
spr0107	-	-	-	Hypothetical protein	0,50	0,47	0,44	0,48	0,40	0,41
spr0108	SP0043	-	-	Putative secretion protein (HlyD family protein)		0,42	0,41			0,40

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
spr0109	SP0115		-	Putative argininosuccinate lyase	0,48		0,42	0,42	0,44	
spr0110	SP0108		-	Putative helix-turn-helix domain protein	0,21	0,28	0,23	0,30	0,32	0,16
spr0127	SP0124		<i>cibB</i>	Competence-induced bacteriocin B			0,46			0,16
spr0128	SP0125		<i>cibA</i>	Competence-induced bacteriocin A			0,35			0,11
spr0181	-		<i>orf47</i>	<i>orf47</i>			0,43			
spr0183	SP0202		<i>nrdD</i>	Ribonucleotide reductase, class III, anaerobic						0,35
spr0184	SP0204		-	Putative acetyltransferase (GNAT family protein)						0,35
spr0185	SP0205		<i>nrdG</i>	NrdD activating enzyme, generating glycyl radical						0,32
spr0186	SP0207		-	Putative anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase						0,43
spr0217	SP0238		-	Putative ACT domain protein (Chain A)						2,86
spr0218	SP0239		-	Putative fructose-6-phosphate aldolase						2,29
spr0264	SP0287		-	Putative xanthine/uracil permease family protein	13,36	12,99	17,98	7,28	25,09	
spr0265	SP0288		-	Putative CAAX amino protease family protein	10,21	9,91	13,95	10,26	12,12	
spr0266	SP0289		<i>sulA</i>	Dihydropteroate synthase	3,95	3,43	4,22	3,64		
spr0267	SP0290		<i>sulB</i>	Dihydrofolate synthetase	5,32	4,02	4,23	3,23	2,02	
spr0268	SP0291		<i>sulC</i>	GTP cyclohydrolase	3,32	3,42	3,49	2,93	2,11	
spr0269	SP0292		<i>sulD</i>	Aldolase-pyrophosphokinase	3,03	2,82	3,44	2,90	2,52	
spr0270	SP0293		-	Hypothetical protein						2,10
spr0276	SP0303		<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase			0,46			2,60
spr0277	SP0304		-	Putative 6-phospho-beta-glucosidase						2,83
spr0282	SP0310		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component						2,55
spr0327	SP0366		<i>aliA</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport						0,41
spr0388	SP0429		-	Hypothetical protein						0,30
spr0389	SP0430		-	Putative acetyl-CoA carboxylase subunit alpha						0,34
spr0401	SP0445		<i>ihvB</i>	Acetolactate synthase large subunit		2,96	2,32			
spr0402	SP0446		<i>ihvN</i>	Acetolactate synthase small subunit		2,25				
spr0403	SP0447		<i>ihvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase		2,17				
spr0405	SP0449		-	Putative ketol-acid reductoisomerase						2,15
spr0445	SP0505		<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme	0,43	0,43	0,24	0,26	0,22	
spr0446	SP0507		<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme <i>Eco</i> KI specificity protein (S protein)				5,19	6,64	5,21
spr0447	SP0506		<i>xerD</i>	Integrase/recombinase	2,02	3,01	2,74			
spr0448	SP0508		<i>hsdS</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease chain S	2,20	3,33	3,28			0,35
spr0461	SP0524		<i>blpT</i>	Hypothetical protein		0,23	0,36			
spr0462	SP0525		<i>blpS</i>	Regulatory protein		0,47				
spr0463	SP0526		<i>rr13</i>	Response regulator		0,37				
spr0464	SP0527		<i>hk13</i>	Histidine kinase			0,50			
spr0465	SP0528		<i>ip</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type		0,30	0,24			

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
spr0466	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	0,40	0,28				0,50
spr0467	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	0,46	0,32				
spr0468	SP0042		<i>blpA</i>	Putative BlpC ABC transporter (ATP-binding protein BlpA)			0,42			0,46
spr0469	SP0042		<i>blpA</i>	SpiA protein			0,37			0,48
spr0470	SP0541		-	Putative bacteriocin BlpO	0,32	0,34				
spr0471	-		-	Hypothetical protein	0,31	0,35				
spr0472	SP0545		<i>blpY</i>	BlpY protein	0,28	0,25				0,50
spr0473	SP0546		<i>blpZ</i>	Putative BlpZ protein (fusion)	0,39	0,28				
spr0474	SP0547		<i>pncP</i>	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate	0,31	0,24			0,48	0,49
spr0482	SP0557		<i>rbfA</i>	Ribosome binding factor A						0,41
spr0504	SP0576		<i>licT</i>	Transcriptional antiterminator (BglG family)						2,36
spr0505	SP0577		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component						2,12
spr0506	SP0578		<i>bglH</i>	6-phospho-beta-glucosidase						2,92
spr0615	SP0703		-	Hypothetical protein	0,48	0,49				0,43
spr0616	SP0704		-	Hypothetical protein						0,37
spr0617	SP0705		-	Putative lipoprotein						0,44
spr0707	SP0798		<i>ciaR</i>	Response regulator, transcriptional regulatory protein				0,36		
spr0708	SP0799		<i>ciaH</i>	Sensor protein CiaH histide kinase				0,38		
spr0709	SP0800		-	Putative membrane protein						2,15
spr0747	SP0845		-	Putative lipoprotein			2,13			
spr0749	SP0847		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - ribose/galactose transport			2,11			
spr0782	SP0879		-	Putative membrane protein				0,27		2,28
spr0810	SP0910		-	Putative PspC domain family protein						4,13
spr0825	SP0924		-	Hypothetical protein	0,32	0,46				
spr0826	SP0925		-	Putative CAAX amino terminal protease family protein	0,46					
spr0856	SP0954		<i>celA</i>	Competence protein			0,28			0,22
spr0857	SP0955		<i>celB</i>	Competence protein			0,34			0,16
spr0859	SP0957		-	Putative ABC transporter						0,47
spr0860	SP0958		-	Putative ribosome recycling factor			0,47			0,45
spr0881	SP0978		<i>coiA</i>	Competence protein			0,30			0,35
spr0901	-		-	Putative branched-chain amino acid aminotransferase						2,08
spr0931	SP1027		-	Putative exported protein			0,42	0,18		
spr0996	SP1088		<i>radC</i>	DNA repair protein			0,33		0,46	0,20
spr1108	SP1228		<i>mutY</i>	Similar to A/G-specific adenine glycosylase	2,44					
spr1109	SP1229		<i>fhs</i>	Formate-tetrahydrofolate ligase	4,20	4,32	3,42	2,33		4,83
spr1120	SP1241		<i>glnP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - glutamine transport					0,50	
spr1121	SP1242		<i>glnQ</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	0,47					

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
	spr1128	SP1249	<i>guaC</i>	GMP reductase	3,79	3,68	5,19	3,07	7,42	
	spr1144	SP1266	<i>smf</i>	DNA processing Smf protein		0,41				0,15
	spr1153	SP1275	<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit						0,43
	spr1154	SP1276	<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit						0,49
	spr1251	SP1394	<i>glnH</i>	ABC transporter substrate-binding protein - glutamine-binding protein						2,05
	spr1290	SP1435	<i>ABC-N/P</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning protein - unknown substrate	2,55	2,89	2,50	2,22	2,07	
	spr1324	SP1470	<i>apbE</i>	Thiamine biosynthesis lipoprotein		0,46				
	spr1352	SP1499	<i>bta</i>	Bacteriocin transport accessory protein						2,35
	spr1378	SP1839	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	2,26	2,25	2,63	2,96	3,30	
	spr1379	SP1839	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	2,43	2,43	3,06	2,71	4,05	
	spr1380	SP1840	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	2,93	2,62	2,87	2,87	4,18	
	spr1381	-	<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation	3,27	2,50	3,00	2,72	4,12	
	spr1382	SP1527	<i>aliB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	3,33	3,15	3,37	2,73	4,89	
	spr1385	SP1531	-	Putative general stress response protein CsbD						3,06
	spr1410	SP1551	<i>pacL</i>	P-type ATPase - calcium transporter						0,50
	spr1441	SP1587	<i>oxlT</i>	Major facilitator:Oxalate:Formate Antiporter	11,50	10,79	12,74		18,47	
	spr1495	SP1651	<i>tpx</i>	Thioredoxin-linked thiol peroxidase						2,01
	spr1538	SP1695	<i>axeI</i>	Xylan esterase 1			0,37			
	spr1549	-	-	Putative exported protein	0,49					
	spr1625	SP1804	-	Putative general stress protein 24	0,49					
	spr1626	SP1805	-	Putative general stress response protein CsbD	0,40					
	spr1628	SP1808	<i>pilD</i>	Type 4 prepilin peptidase			0,42			0,34
	spr1640	SP1822	-	Hypothetical protein						2,51
	spr1641	SP1823	<i>mgtC</i>	Mg(2+) transport ATPase/permease						5,63
	spr1642	-	-	Hypothetical protein						3,20
	spr1643	SP1824	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate						3,75
	spr1644	SP1825	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate						4,03
	spr1645	SP1826	<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate						4,38
	spr1646	SP1827	-	Hypothetical protein						4,23
	spr1647	SP1828	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase						3,33
	spr1648	SP1829	<i>galT</i>	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase						3,25
	spr1649	SP1830	-	Putative phosphate transporter PhoU						3,73
	spr1650	SP1831	-	Hypothetical protein						3,53
	spr1651	SP1832	-	Hypothetical protein						3,32
	spr1652	SP1833	-	Putative cell wall surface anchor family protein						2,92
	spr1662	SP1847	<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosyltransferase	9,95	10,49	10,32	5,36	11,87	
	spr1663	SP1848	<i>pbuX</i>	Nucleobase:cation symporter for xanthine	8,58	9,71	9,36	5,05	9,74	
















Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
spr1670	SP1855		<i>adhB</i>	Alcohol dehydrogenase						2,59
spr1671	SP1856		-	Putative MerR family transcriptional regulator				2,32	2,06	2,84
spr1672	SP1857		<i>czcD</i>	Cation diffusion facilitator transporter - heavy metal transport						2,43
spr1724	SP1540		<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein	0,44	0,39				0,16
spr1756	SP1939		<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein						0,45
spr1757	SP1940		<i>recA</i>	DNA recombination/repair			0,49			
spr1758	SP1941		<i>cinA</i>	Competence induced protein			0,48			0,36
spr1762	SP1945		-	Putative lipoprotein			0,38			
spr1763	SP1946		<i>plcR</i>	Transcriptional activator						6,67
spr1764	SP1947		-	Hypothetical protein						5,59
spr1765	SP1948		-	Hypothetical protein						5,31
spr1766	SP1949		-	Hypothetical protein						7,76
spr1767	SP1950		<i>cylM</i>	CylM protein, cytolytic toxin system						20,95
spr1768	SP1951		-	Hypothetical protein						18,76
spr1769	SP1952		-	Putative lipoprotein						19,81
spr1770	SP1953		<i>chyB</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein						21,88
spr1771	SP1955		<i>nisP</i>	Subtilisin-like serine protease						10,02
spr1772	SP1956		-	Putative bacteriocin-associated integral membrane protein						8,44
spr1773	SP1957		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate						8,51
spr1774	SP1958		-	Putative competence damage-inducible protein A						7,02
spr1776	SP1960		<i>rpoC</i>	DNA-dependent RNA polymerase						0,50
spr1792	SP1978		<i>lysA</i>	Diaminopimelate decarboxylase						2,10
spr1800	SP1986		-	Hypothetical protein	4,31	4,60	4,94	4,54		7,62
spr1801	SP1987		<i>ABC-NBD</i>	Putative ABC-type antimicrobial peptide transport system (ATPase component)	3,90	4,43	4,55	3,92		6,60
spr1802	SP1988		-	Putative immunity protein	4,84	5,45	5,70	3,95		7,77
spr1819	SP2006		<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator	0,45	0,40				0,13
spr1856	-		-	Putative methyltransferase small domain superfamily	0,50	0,43				0,15
spr1857	-		-	Putative methyltransferase small domain superfamily						0,37
spr1858	SP2047		-	Putative exported protein			0,42			0,13
spr1859	SP2048		-	Putative competence protein ComGF			0,37			0,12
spr1861	SP2050		<i>cglD</i>	Competence protein			0,35			0,10
spr1862	SP2051		<i>cglC</i>	Competence protein			0,36			0,12
spr1863	SP2052		<i>cglB</i>	Competence protein						0,12
spr1864	SP2053		<i>cglA</i>	Competence protein						0,12
spr1865	SP2054		-	Putative DNA-binding protein						2,07
spr1866	SP2055		<i>adh</i>	Putative alcohol dehydrogenase				0,48		
spr1875	SP0664		-	Putative LysM domain-containing protein				0,37	0,30	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6					
					C106	C206	C306	C406	C506	C606
spr1895	SP2084		<i>pstS</i>	ABC transporter substrate-binding protein - phosphate transport				2,01		4,76
spr1915	SP2105		-	Putative membrane protein	0,46					
spr1916	SP2106		<i>malP</i>	Maltodextrin phosphorylase				0,37		
spr1917	SP2107		<i>malM</i>	4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase)				0,32		
spr1936	SP2127		<i>tktC</i>	Putative transketolase c-terminal section						2,47
spr1937	SP2128		<i>tktN</i>	Putative transketolase n-terminal section						2,31
spr1938	SP2129		-	Putative ascorbate-specific PTS system enzyme IIC						2,31
spr1939	SP2130		-	Putative PTS-system (IIB component)						2,36
spr1940	SP2131		-	Putative transcriptional regulator (BglG family protein)						2,23
spr1972	SP2166		<i>fucA</i>	L-fucose phosphate aldolase	0,43					
spr1983	SP0145		-	Conserved hypothetical protein						2,00
spr1987	SP2183		-	ORF3				0,48		
spr1988	SP2184		<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	0,43			0,34		
spr1989	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation				0,38		
spr1990	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation				0,35		
spr1991	SP2186		<i>glpK</i>	Glycerol kinase				0,42		
spr2006	SP2201		<i>cbpD</i>	Choline binding protein D	0,46	0,33				0,14
spr2012	SP2207		<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)			0,29			0,13
spr2013	SP2208		<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases						0,13
spr2041	SP2235		<i>comE</i>	Response regulator			0,48			0,16
spr2042	SP2236		<i>comD</i>	Histidine protein kinase	0,50	0,27				0,12
spr2043	SP2237		<i>comC</i>	Competence stimulating peptide precursor (CSP)			0,32			0,12
spr2045	SP2239		<i>sphtra</i>	Serine protease			0,49	0,19		
spr2046	SP2240		<i>spo0J</i>	Chromosome segregation protein			0,44	0,19		
tRNA__Val3										0,50

Tab. 7.6: Das Transkriptom von C606 bei einer Zelldichte von N=40 bei 30 und 37 °C im Vergleich.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche von C606 bei 37 °C mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis (AVG ≥ 2 oder $\leq 0,5$) zu C606 bei 30 °C, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei 30 bzw. 37 °C Inkubation und einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von C606 bei 30 °C an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 2 oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 3 oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycerolipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Gen	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis C606 bei 37 °C/C606 bei 30 °C
	AE005672_106519	SP0103 ... SP0104			3,42
	AE005672_1165415	SP1232 ... SP1233			2,98
	AE005672_127537	SP0123 ... SP0124			5,42
	AE005672_1724126	SP1810 ... SP1811			3,06
	AE005672_512951	SP0533 ... SP0534			4,45
	AE005672_698007	SP0733 ... SP0734			2,03
AE007317_1166915		spr1164 ... spr1165			0,48
AE007317_1604241		spr1630 ... spr1631			2,16
AE007317_1917704		spr1935 ... spr1936			2,67
AE007317_22405		spr0020 ... spr0021			2,58
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031			2,03
AE007317_305821		spr0306 ... spr0307			4,12
AE007317_359743		spr0361 ... spr0362			0,31
AE007317_386658		spr0388 ... spr0389			2,43
AE007317_387127		spr0389 ... spr0390			2,58
AE007317_39745		spr0040 ... spr0041			2,57
AE007317_400958		spr0404 ... spr0405			2,10
AE007317_461579		spr0454 ... spr0455			0,42
■ spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16	7,37
-	SP0040		-	Hypothetical protein	2,56

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Gen	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis C606 bei 37 °C/C606 bei 30 °C
-	SP0089		-	Hypothetical protein	3,45
-	SP0094		-	Hypothetical protein	4,52
	SP0123		<i>ccsI</i>	competence-induced protein CcsI	6,56
-	SP0126		-	Hypothetical protein	3,32
-	SP0518		-	Putative tRNA (guanine-N(7)) -methyltransferase	0,40
	spr0040		<i>blpK</i>	bacteriocin BlpK	4,75
	spr0040		<i>blpO</i>	bacteriocin BlpO	3,20
spr1360	SP1317		<i>ntpA</i>	v-type sodium ATP synthase, subunit A	2,24
-	SP2049		-	Putative pseudopilin PulG (Type II secretory pathway)	15,95
spr0020	SP0018		-	Putative recombination regulator RecX	7,33
spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein CcsI6	7,74
	spr0031		-	Putative ribose-phosphate pyrophosphokinase	2,94
	spr0040		<i>thmA</i>	Amphipathic pore-forming peptide precursor	4,96
	spr0043		<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA	4,85
	spr0044		<i>comB</i>	Transport protein ComB	7,95
spr0080	SP0088		-	Hypothetical protein	2,28
spr0096	SP0107		-	Putative LysM domain protein	2,35
	spr0127		<i>cibB</i>	Competence-induced bacteriocin B	8,29
	spr0128		<i>cibA</i>	Competence-induced bacteriocin A	15,44
spr0181	-		<i>orf47</i>	<i>orf47</i>	2,26
spr0307	SP0338		<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	3,63
	spr0356		<i>mtlA</i>	Mannitol PTS EII	0,27
spr0357	SP0395		-	Putative transcriptional regulator	0,32
	spr0358		<i>mtlF</i>	Mannitol-specific enzyme IIA component	0,45
	spr0359		<i>mtlD</i>	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	0,43
spr0360	SP0398		-	Hypothetical protein	0,38
	spr0361		-	Putative amino acid ABC transporter (ATP-binding protein)	0,32
spr0388	SP0429		-	Hypothetical protein	2,47
	spr0389		-	Putative acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	2,59
spr0404	SP0448		-	Putative threonine dehydratase	2,22
spr0405	SP0449		-	Putative ketol-acid reductoisomerase	2,26
	spr0453		<i>hrcA</i>	Heat inducible transcription repressor	0,34

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Gen	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis C606 bei 37 °C/C606 bei 30 °C
spr0454	SP0516		<i>grpE</i>	Heat-shock protein (activation of DnaK)	0,34
spr0455	SP0517		<i>dnaK</i>	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)	0,40
spr0456	SP0519		<i>dnaJ</i>	Heat-shock protein (activation of DnaK)	0,49
spr0461	SP0524		<i>blpT</i>	Hypothetical protein	4,63
spr0465	SP0528		<i>ip</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type	5,89
spr0466	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	9,27
spr0467	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	9,50
spr0468	SP0042		<i>blpA</i>	Putative BlpC ABC transporter (ATP-binding protein)	8,08
spr0469	SP0042		<i>blpA</i>	SpiA protein	7,39
spr0470	SP0541		-	Putative bacteriocin BlpO	8,55
spr0471	-		-	Hypothetical protein	7,51
spr0472	SP0545		<i>blpY</i>	BlpY protein	7,86
spr0473	SP0546		<i>blpZ</i>	Putative BlpZ protein (fusion)	5,26
spr0474	SP0547		<i>pncP</i>	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate	8,27
spr0652	SP0742		-	Putative DegV family protein	2,18
spr0690	SP0782		-	Putative cytosolic protein	3,05
spr0782	SP0879		-	Putative membrane protein	2,49
spr0786	SP0883		-	Putative esterase family protein	2,04
spr0788	SP0884		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase	2,19
spr0789	SP0885		-	Putative carbamoylphosphate synthase (large subunit)	2,38
spr0810	SP0910		-	Putative PspC domain family protein	2,07
spr0856	SP0954		<i>celA</i>	Competence protein	8,60
spr0857	SP0955		<i>celB</i>	Competence protein	14,98
spr0859	SP0957		-	Putative ABC-transporter (ATP-binding protein)	2,43
spr0860	SP0958		-	Putative ribosome recycling factor	2,49
spr0865	SP0963		<i>pyrDII</i>	Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit	0,43
spr0866	SP0964		<i>pyrD</i>	Dihydroorotate dehydrogenase	0,43
spr0881	SP0978		<i>coiA</i>	Competence protein	7,61
spr0931	SP1027		-	Putative exported protein	2,63
spr0996	SP1088		<i>radC</i>	DNA repair protein	8,97
spr1144	SP1266		<i>smf</i>	DNA processing Smf protein	16,62
spr1153	SP1275		<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit	0,44

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Gen	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis C606 bei 37 °C/C606 bei 30 °C
	spr1154	SP1276	<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit	0,44
	spr1155	SP1277	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase	0,44
	spr1156	SP1278	<i>pyrR</i>	Transcriptional attenuation of the pyrimidine operon / uracil phosphoribosyltransferase activity	0,46
	spr1200	SP1338	-	Hypothetical protein	2,14
	spr1319	SP1465	-	Putative cytoplasmic protein	2,03
	spr1484	-	-	Hypothetical protein	2,16
	spr1547	SP1705	-	Hypothetical protein	0,44
	spr1548	SP1706	-	Putative membrane protein	0,45
	spr1622	SP1800	-	Putative transcriptional activator	0,47
	spr1628	SP1808	<i>piID</i>	Type 4 prepilin peptidase	4,01
	spr1684	SP1869	<i>fatD</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport	0,49
	spr1687	SP1872	<i>fatB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - ferric iron transport	0,50
	spr1713	SP1898	<i>aga</i>	Alpha-galactosidase (melibiase)	2,08
	spr1724	SP1540	<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein	21,96
	spr1756	SP1939	<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein	2,32
	spr1757	SP1940	<i>recA</i>	DNA recombination/repair	2,87
	spr1758	SP1941	<i>cinA</i>	Competence induced protein	5,26
	spr1762	SP1945	-	Putative lipoprotein	2,24
	spr1819	SP2006	<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator	6,24
	spr1829	SP2016	<i>nadC</i>	Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	2,79
	spr1831	SP0111	-	Putative conserved domain protein	3,59
	spr1856	-	-	Putative methyltransferase small domain superfamily	16,86
	spr1857	-	-	Putative methyltransferase small domain superfamily	6,25
	spr1858	SP2047	-	Putative exported protein	16,23
	spr1859	SP2048	-	Putative competence protein ComGF	14,47
	spr1861	SP2050	<i>cglD</i>	Competence protein	15,75
	spr1862	SP2051	<i>cglC</i>	Competence protein	16,11
	spr1863	SP2052	<i>cglB</i>	Competence protein	19,11
	spr1864	SP2053	<i>cglA</i>	Competence protein	16,26
	spr1875	SP0664	-	Putative LysM domain-containing protein	2,16
	spr1936	SP2127	<i>tktC</i>	Putative transketolase c-terminal section	3,09
	spr1937	SP2128	<i>tktN</i>	Putative transketolase n-terminal section	3,29

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Gen	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis C606 bei 37 °C/C606 bei 30 °C
spr1938	SP2129		-	Putative ascorbate-specific PTS system enzyme II	3,18
spr1939	SP2130		-	Putative PTS system (IIB component)	3,01
spr1940	SP2131		-	Putative transcriptional regulator (BglG family protein)	2,95
spr1987	SP2183		-	ORF3	0,41
spr1988	SP2184		<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	0,35
spr1989	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,28
spr1990	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,27
spr1991	SP2186		<i>glpK</i>	Glycerol kinase	0,41
spr1992	SP2187		-	Putative Hsp33-like chaperon	0,47
spr2006	SP2201		<i>cbpD</i>	Choline binding protein D	13,06
spr2012	SP2207		<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)	18,62
spr2013	SP2208		<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases	16,90
spr2041	SP2235		<i>comE</i>	Response regulator	4,21
spr2042	SP2236		<i>comD</i>	Histidine protein kinase	16,20
spr2043	SP2237		<i>comC</i>	Competence stimulating peptide precursor (CSP)	24,36
spr2045	SP2239		<i>sphtra</i>	Serine protease	3,54
spr2046	SP2240		<i>spo0J</i>	Chromosome segregation protein	3,38

Tab. 7.7: Das Transkriptom von C301 und C401 bei einer Zelldichte von N=40.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche von C301 und C401 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$) zu R6, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von R6 an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung ($Transkriptmengenverhältnis \geq 2$ oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung ($Transkriptmengenverhältnis \geq 3$ oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycero(phospho)lipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C301	C401
	AE005672_1207860	SP1274 ... SP1275				2,09
	AE005672_132391	SP0131 ... SP0132				2,24
	AE005672_136810	SP0137 ... SP0138				2,55
	AE005672_45209	SP0044 ... SP0045			0,43	
	AE005672_94866	SP0091 ... SP0092				0,39
AE007317_1015888		spr1032 ... spr1033				0,39
AE007317_1166915		spr1164 ... spr1165				0,40
AE007317_142308		spr0134 ... spr0135				2,75
AE007317_146382		spr0137 ... spr0138				7,73
AE007317_1503011		spr1526 ... spr1527				0,43
AE007317_1514170		spr1535 ... spr1536				0,45
AE007317_1531844		spr1549 ... spr1550				8,50
AE007317_281043		spr0282 ... spr0283				2,52
AE007317_28366		spr0027 ... spr0028				2,29
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031				2,08
AE007317_465862		spr0456 ... spr0457				2,50
AE007317_489321		spr0488 ... spr0489				0,33
AE007317_500572		spr0503 ... spr0504			2,60	
AE007317_562193		spr0560 ... spr0561				0,46
AE007317_671089		spr0667 ... spr0668				2,87
AE007317_736095		spr0737 ... spr0738				0,48
AE007317_818212		spr0815 ... spr0816				2,02

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C301	C401
AE007317_827276		spr0824 ... spr0825				3,67
AE007317_972850		spr0988 ... spr0989				5,38
spr0030	SP0029	-	-	Putative competence-induced protein Ccs16		2,25
-	SP0052	-	-	Hypothetical protein		0,23
spr0135	SP0133	-	-	Putative glycosyltransferase group 1 family protein		2,25
spr0135	SP0135	-	-	glycosyl transferase, putative		3,06
spr0040	SP0531		<i>blpI</i>	bacteriocin BlpI		0,30
spr0641	SP0729	-	-	cation-transporting ATPase, E1-E2 family		0,50
-	SP1216	-	-	Hypothetical protein		0,36
spr0780	SP1619	-	-	PTS system, IIA component		2,50
-	SP1834	-	-	Putative chlorohydrolase		2,85
spr0023	SP0021		<i>dut</i>	Deoxyuridinetriphosphatase		2,22
spr0026	SP0024	-	-	Putative carbonate dehydratase		2,01
spr0030	SP0029	-	-	Putative competence-induced protein Ccs16		2,35
spr0044	SP0043		<i>comB</i>	Transport protein ComB		2,76
spr0045	SP0044		<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase	0,45	0,08
spr0046	SP0045		<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase	0,20	0,55
spr0047	SP0046		<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase		0,23
spr0050	SP0049		<i>vanZ</i>	Teicoplanin resistance protein/Putative bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide-formyltransferase (IMP cyclohydrolase)		0,38
spr0052	SP0051		<i>purD</i>	Phosphoribosylglycinamide synthetase	0,43	0,03
spr0053	SP0053		<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit		0,38
spr0054	SP0054		<i>purK</i>	Phosphoribosyl glucinamide formyltransferase		0,70
spr0060	SP0061		<i>PTS-EIIB</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component		0,31
spr0081	SP0090		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport		0,29
spr0082	SP0091		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - sugar transport		0,27
spr0083	SP0092		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter solute binding protein - sugar transport		0,43
spr0135	SP0133		<i>epsG</i>	Glycosyltransferase involved exopolysaccharide (EPS) synthesis		2,75
spr0136	SP0136		<i>glycosyltransferase</i>	Glycosyl transferase, family 2		2,85
spr0137	SP0137		<i>ABC-NP</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane spanning permease - possible multidrug resistance		2,06
spr0157	SP0159		-	Putative Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the Nramp family		0,37
spr0181	-		<i>orf47</i>	orf47		2,05
spr0246	SP0267	-	-	Putative oxidoreductase		2,65
spr0259	SP0282		<i>manN</i>	Phosphotransferase system, mannose-specific EIID		0,45
spr0260	SP0283		<i>manM</i>	Phosphotransferase system, mannose-specific EIIC		0,46
spr0264	SP0287	-	-	Putative xanthine/uracil permease family protein		0,30
spr0288	SP0318		<i>kdgK</i>	2-keto-3-deoxygluconate kinase		0,37
spr0290	SP0320		<i>gno</i>	5-keto-D-gluconate 5-reductase		0,30

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C301	C401
spr0295	SP0325		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		0,29
spr0296	SP0326		-	Putative preprotein translocase (YajC subunit)		0,23
spr0401	SP0445		<i>ilyB</i>	Acetolactate synthase large subunit		0,43
spr0402	SP0446		<i>ilyN</i>	Acetolactate synthase small subunit		0,47
spr0445	SP0505		<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme	0,39	
spr0446	SP0507		<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme <i>Eco</i> KI specificity protein (S protein)	3,43	
spr0468	SP0042		<i>blpA</i>	Putative BlpC ABC transporter (ATP-binding protein BlpA)		0,43
spr0469	SP0042		<i>blpA</i>	SpiA protein		0,44
spr0504	SP0576		<i>licT</i>	Transcriptional antiterminator (BglG family)		0,43
spr0505	SP0577		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		0,40
spr0522	SP0595		-	Hypothetical protein		0,49
spr0613	SP0701		<i>pyrF</i>	Orotidine-5'-decarboxylase		0,45
spr0639	SP0727		<i>copY</i>	COPAB ATPases metal-fist type repressor		0,47
spr0640	SP0728		-	Putative Copper-translocating P-type ATPase		0,42
spr0649	SP0739		<i>mta</i>	Regulator of the multidrug efflux pump <i>pmrA</i>		2,08
spr0785	SP0882		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase		0,43
spr0788	SP0884		-	Putative x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase		0,38
spr0789	SP0885		-	Putative carbamoylphosphate synthase (large subunit)		0,44
spr0812	SP0912		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate		3,78
spr0908	SP1004		<i>phtE</i>	Pneumococcal histidine triad protein E precursor		0,43
spr0911	SP1006		-	Putative transposase		2,59
spr0921	SP1017		<i>xylH</i>	4-oxalorotate tautomerase		2,28
spr0957	SP1056		<i>relaxase-truncation</i>	Tn5252, relaxase, truncation		2,09
spr0973	SP1067		<i>ftsW</i>	Cell division protein FtsW		0,44
spr0996	SP1088		<i>radC</i>	DNA repair protein		2,60
spr1017	SP1110		<i>mreA</i>	Macrolide-efflux protein		
spr1032	SP1124		<i>glgA</i>	Glycogen synthase		0,43
spr1033	SP1551		<i>serB-truncation</i>	Phosphoserine phosphatase, truncation		0,38
spr1047	SP1160		<i>lplA</i>	Lipoate protein ligase A		2,06
spr1070	SP1185		<i>lacE</i>	PTS system, lactose-specific IIBC component	2,03	
spr1109	SP1229		<i>fts</i>	Formate-tetrahydrofolate ligase		0,48
spr1128	SP1249		<i>guaC</i>	GMP reductase		0,08
spr1129	SP1250		-	Putative 3-isopropylmalate dehydrogenase		2,26
spr1130	SP1251		-	Putative endonuclease		2,45
spr1144	SP1266		<i>smf</i>	DNA processing Smf protein		2,04
spr1152	SP1274		<i>licD2</i>	licD2 Protein		2,28
spr1153	SP1275		<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit		0,34



Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C301	C401
spr1154	SP1276		<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit		0,32
spr1155	SP1277		<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase		0,44
spr1156	SP1278		<i>pyrR</i>	Transcriptional attenuation of the pyrimidine operon / uracil phosphoribosyltransferase activity		0,36
spr1200	SP1338		-	Hypothetical protein		2,33
spr1208	SP1349		-	Putative Tn5253 conserved hypothetical protein		2,36
spr1251	SP1394		<i>glnH</i>	ABC transporter substrate-binding protein - glutamine-binding protein		2,34
spr1274	SP0117		<i>spsA-truncation</i>	Choline binding protein		0,47
spr1294	-		-	Putative transposase		2,50
spr1295	-		<i>transposase G</i>	Transposase, uncharacterized, truncation		2,35
spr1450	SP1598		<i>pdxK</i>	Pyridoxine kinase		2,23
spr1451	SP1599		<i>truA</i>	tRNA pseudouridine synthase A		2,00
spr1485	SP1643		-	Hypothetical protein		2,30
spr1524	SP1680		-	Conserved hypothetical protein		0,45
spr1525	SP1681		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport		0,40
spr1526	SP1682		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport		0,35
spr1545	SP1703		-	Putative GTP-binding protein EngA		346,37
spr1546	SP1704		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate		43,97
spr1547	SP1705		-	Hypothetical protein		35,91
spr1548	SP1706		-	Putative membrane protein		32,53
spr1549	-		-	Putative exported protein		4,29
spr1638	-		-	Hypothetical protein		2,21
spr1640	SP1822		-	Hypothetical protein		0,24
spr1641	SP1823		<i>mgfC</i>	Mg(2+) transport ATPase/permease		0,38
spr1643	SP1824		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate		0,21
spr1644	SP1825		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate		0,38
spr1645	SP1826		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate		0,38
spr1646	SP1827		-	Hypothetical protein		0,39
spr1647	SP1828		<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase		0,33
spr1648	SP1829		<i>galT</i>	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase		0,42
spr1663	SP1848		<i>pbuX</i>	Nucleobase:cation symporter for xanthine	0,47	0,48
spr1684	SP1869		<i>fatD</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport		0,25
spr1687	SP1872		<i>fatB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - ferric iron transport		0,25
spr1709	SP1894		<i>gtfA</i>	Dextranucrase (sucrose 6-glucosyltransferase)		2,38
spr1713	SP1898		<i>aga</i>	Alpha-galactosidase (melibiase)		2,96
spr1724	SP1540		<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein		3,86
spr1736	SP1919		<i>ABC-NBD-truncation</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate, truncation		5,87
spr1738	SP1922		-	Conserved hypothetical protein		2,05

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C301	C401
	spr1762	SP1945	-	Putative lipoprotein		2,25
	spr1819	SP2006	<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator		2,73
	spr1826	SP2013	-	Putative efflux ABC transporter (permease protein)		2,89
	spr1829	SP2016	<i>nadC</i>	Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase		2,33
	spr1831	SP0111	-	Putative conserved domain protein		3,03
	spr1837	SP2026	<i>adhE</i>	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase		0,33
	spr1869	SP2058	<i>tgt</i>	tRNA-guanine transglycosylase (guanine insertion enzyme)		0,46
	spr1883	SP2071	-	Hypothetical protein		0,37
	spr1884	SP2072	<i>guaA</i>	Glutamine amidotransferase		0,37
	spr1942	SP2133	-	Hypothetical protein		2,69
	spr1945	SP2136	<i>pcpA</i>	Choline-binding protein		0,36
	spr1959	SP2152	-	Conserved hypothetical integral membrane protein		0,44
	spr1961	SP0071	-	Putative L-fucose isomerase		2,00
	spr1990	SP2185	<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation		0,43
	spr1991	SP2186	<i>glpK</i>	Glycerol kinase		0,43
	spr2012	SP2207	<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)		2,23
	spr2013	SP2208	<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases		2,04
	spr2037	-	-	Putative integral membrane protein		3,51
	spr2041	SP2235	<i>comE</i>	Response regulator		2,48
	tRNA-Asn2					2,20
	tRNA-Glu5				2,34	

Tab. 7.8: Das Transkriptom von C202 und C402 bei einer Zelldichte von N=40.

Aufgeführt sind alle Gene und intergenen Bereiche von C202 und C402 mit einem mindestens 2fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$) zu R6, einem angepassten P-Wert von 0,01 (1 %) und einer FDR von $\leq 0,05$ (5 %). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von N=40 gewonnen. Es wurde das kombinierte R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Zusätzlich zu den annotierten R6-Genen (Genbanknummer NC_003098) sind die jeweiligen homologen TIGR4-Gene (Genbanknummer NC_003028) angegeben. Die Lage der intergenen Regionen ist durch die flankierenden Gene markiert. Die Bezeichnung bzw. Funktion von charakterisierten Genen ist aufgelistet. Hypothetischen Genprodukten konnte aufgrund von bei Blast-Analysen gefundenen Homologien putative Funktionen zugeordnet werden, die ebenfalls aufgezeigt sind. Die Farbe, mit der die Werte der Transkriptmengenverhältnisse hinterlegt ist, deutet jeweils den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Transkription im Vergleich zu der von R6 an: gelb: keine signifikante Veränderung; hellrot bzw. hellgrün: mindestens 2fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 2 oder $\leq 0,5$); dunkelrot bzw. dunkelgrün: mindestens 3fache Erhöhung bzw. Erniedrigung (Transkriptmengenverhältnis ≥ 3 oder $\leq 0,33$). Die Gene sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, welche mit unterschiedlichen Farben am linken Rand gekennzeichnet sind: Blau: Gene des Kompetenz-Regulons; lila: Gene für Bakteriocinproduktion und -immunität; rot: Gene des CiaRH-Regulons; grün: Gene des Stickstoffmetabolismus; braun: Gene des Kohlenstoffmetabolismus; gelb: Gene des Glycerolipidmetabolismus; orange: Gene für (ABC-) Transporter.






















Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
	AE005672_1207860	SP1274 ... SP1275			3,17	3,00
	AE005672_127537	SP0123 ... SP0124				0,31
	AE005672_132391	SP0131 ... SP0132			0,46	
	AE005672_1724126	SP1810 ... SP1811				0,12
	AE005672_1843103	SP1939 ... SP1940				0,50
	AE005672_316945	SP0342 ... SP0343			3,35	8,16
	AE005672_698007	SP0733 ... SP0734			2,22	
AE007317_1015888		spr1032 ... spr1033				0,49
AE007317_1039495		spr1045 ... spr1046			2,12	
AE007317_113125		spr0104 ... spr0105			2,69	
AE007317_1157926		spr1153 ... spr1154			0,48	
AE007317_1166915		spr1164 ... spr1165			0,43	
AE007317_1349379		spr1367 ... spr1368				2,05
AE007317_140971		spr0133 ... spr0134			0,46	
AE007317_1451068		spr1469 ... spr1470				2,26
AE007317_1520397		spr1538 ... spr1539			2,43	8,71
AE007317_1545149		spr1564 ... spr1565				2,26
AE007317_1604241		spr1630 ... spr1631				0,25
AE007317_1634693		spr1661 ... spr1662			0,29	0,42
AE007317_1647157		spr1674 ... spr1675				2,79
AE007317_1665694		spr1696 ... spr1697			2,03	
AE007317_1717358		spr1745 ... spr1746				2,56

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
AE007317_1723154		spr1755 ... spr1756				0,44
AE007317_1735558		spr1767 ... spr1768				0,37
AE007317_173760		spr0164 ... spr0165				2,13
AE007317_1899538		spr1917 ... spr1918			2,73	4,57
AE007317_1917704		spr1935 ... spr1936			0,41	
AE007317_1998757		spr2005 ... spr2006				0,25
AE007317_2007946		spr2014 ... spr2015			2,12	
AE007317_2038404		spr2046 ... spr0001			2,81	3,48
AE007317_22405		spr0020 ... spr0021				0,15
AE007317_233680		spr0239 ... spr0240			5,46	
AE007317_272097		spr0270 ... spr0271				0,44
AE007317_281043		spr0282 ... spr0283			2,17	6,70
AE007317_30482		spr0030 ... spr0031				0,21
AE007317_305821		spr0306 ... spr0307			2,05	0,24
AE007317_386658		spr0388 ... spr0389				0,13
AE007317_387127		spr0389 ... spr0390				0,11
AE007317_450280		spr0444 ... spr0445				5,15
AE007317_461579		spr0454 ... spr0455				0,33
AE007317_465862		spr0456 ... spr0457				0,33
AE007317_562193		spr0560 ... spr0561			0,46	
AE007317_56907		spr0052 ... spr0053				0,33
AE007317_74337		spr0067 ... spr0068			2,34	
AE007317_772962		spr0777 ... spr0778				0,48
AE007317_918891		spr0932 ... spr0933				3,89
 spr0030	SP0029		-	Putative competence-induced protein Ccs16		0,06
-	SP0040		-	Hypothetical protein	0,33	0,38
-	SP0089		-	Hypothetical protein	3,59	
 -	SP0123		<i>ccsI</i>	competence-induced protein Ccs1		0,07
spr1214	SP0174		-	Putative chlorohydrolase		0,49
 spr0186	SP0207		-	Putative phosphoribulokinase (Uridine kinase family)	2,15	
-	SP0428		-	Hypothetical protein		0,31
-	SP0503		-	Hypothetical protein		2,31
-	SP0518		-	Putative tRNA (guanine-N(7)) -methyltransferase		0,36
 spr0040	SP0533		<i>blpK</i>	bacteriocin BlpK	0,20	0,27
spr0527	SP0602		<i>pep27</i>	pep27 protein	2,00	3,12
-	SP1103		-	Hypothetical protein		2,23
-	SP1254		-	Putative translation factor		2,21

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr0255	SP1801	-	-	GlsB protein		2,81
-	SP1892	-	-	Hypothetical protein		0,22
-	SP2177	-	-	Putative D-Ala-teichoic acid biosynthesis protein		2,92
spr0020	SP0018	-	-	Putative recombination regulator RecX		0,04
spr0021	SP0019	-	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase		0,46
spr0023	SP0021	-	<i>dut</i>	Deoxyuridinetriphosphatase		0,49
spr0024	SP0022	-	-	Putative phosphoglycerate mutase family protein		0,46
spr0025	-	-	<i>rada</i>	DNA repair: sensitivity to gamma and UV radiation		0,40
spr0030	SP0029	-	-	Putative competence-induced protein Ccs16		0,04
spr0031	SP0031	-	-	Putative ribose-phosphate pyrophosphokinase		0,16
spr0040	SP0041	-	<i>thmA</i>	Amphipathic pore-forming peptide precursor	0,18	0,21
spr0043	SP0042	-	<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA		0,05
spr0044	SP0043	-	<i>comB</i>	Transport protein ComB	3,13	0,06
spr0045	SP0044	-	<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase	0,19	0,09
spr0046	SP0045	-	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase		0,26
spr0047	SP0046	-	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase		0,39
spr0052	SP0051	-	<i>purD</i>	Phosphoribosylglycinamide synthetase	0,25	0,14
spr0053	SP0053	-	<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	0,42	0,23
spr0054	SP0054	-	<i>purK</i>	Phosphoribosyl glucinamide formyltransferase	0,46	0,24
spr0062	SP0063	-	<i>PTS-EIID</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EIID component		0,41
spr0067	-	-	-	Conserved hypothetical protein	2,23	
spr0075	SP0082	-	-	Putative cell wall surface anchor family protein		3,52
spr0080	SP0088	-	-	Hypothetical protein	3,17	
spr0081	SP0090	-	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport	0,39	0,25
spr0082	SP0091	-	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - sugar transport	0,46	0,34
spr0084	SP0095	-	-	Putative rhodanese domain-containing protein		0,43
spr0086	SP0097	-	-	Hypothetical protein		2,11
spr0087	SP0098	-	-	Putative exported protein		2,23
spr0088	SP0099	-	-	Putative membrane protein		2,47
spr0089	SP0100	-	-	Putative transcriptional regulator PadR family		3,18
spr0091	SP0102	-	-	Putative glycosyl transferase (Group 2 family protein)	2,12	
spr0092	SP0103	-	<i>capD</i>	CapD protein, required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide	2,63	2,70
spr0105	SP0042	-	<i>Transporter-truncation</i>	Transporter, truncation	2,49	
spr0107	-	-	-	Hypothetical protein	3,02	
spr0108	SP0043	-	-	Putative secretion protein (HlyD family protein)	2,85	
spr0157	SP0159	-	-	Putative Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the Nramp family	0,45	
spr0161	SP0175	-	<i>ribE</i>	Riboflavin synthase beta chain		0,43

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr0181	-		<i>orf47</i>	orf47		0,24
spr0182	SP0200		-	Putative competence-induced protein Ccs4		0,44
spr0196	SP0216		<i>rplP</i>	50S Ribosomal protein L16		0,48
spr0197	SP0217		<i>rpmC</i>	50S Ribosomal protein L29		0,44
spr0201	SP0221		<i>rplE</i>	50S Ribosomal protein L5		0,48
spr0216	SP0237		<i>rplQ</i>	50S Ribosomal protein L17	0,26	
spr0219	SP0240		<i>gpmB</i>	Phosphoglycerate mutase 2 paralog	2,89	2,08
spr0240	SP0261		<i>uppS</i>	Undecaprenyl diphosphate synthase	2,44	
spr0258	SP0281		<i>pepC</i>	Aminopeptidase C	2,83	3,71
spr0259	SP0282		<i>manN</i>	Phosphotransferase system, mannose-specific EIID	0,48	0,29
spr0260	SP0283		<i>manM</i>	Phosphotransferase system, mannose-specific EIIC	0,41	0,35
spr0263	SP0286		-	Putative COF family protein	2,28	3,12
spr0264	SP0287		-	Putative xanthine/uracil permease family protein	0,26	0,09
spr0270	SP0293		-	Hypothetical protein		3,32
spr0276	SP0303		<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	2,45	6,86
spr0277	SP0304		-	Putative 6-phospho-beta-glucosidase		3,57
spr0278	SP0305		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		2,92
spr0280	SP0308		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	2,18	3,29
spr0282	SP0310		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	2,94	5,78
spr0285	SP0313		<i>basA</i>	Glutathione peroxidase		2,24
spr0307	SP0338		<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit		0,24
spr0310	SP0342		<i>dexB</i>	Alpha, 1-6-glucosidase		3,07
spr0311	SP1527		-	Putative lipoprotein	4,35	7,51
spr0314	SP0346		<i>cps2A</i>	The type 2 capsule locus of <i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,42	
spr0327	SP0366		<i>aliA</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	0,32	0,43
spr0338	SP0381		<i>mvk</i>	Mevalonate kinase		2,03
spr0388	SP0429		-	Hypothetical protein		0,10
spr0389	SP0430		-	Putative acetyl-CoA carboxylase subunit alpha		0,13
spr0401	SP0445		<i>ihvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	0,42	
spr0402	SP0446		<i>ihvN</i>	Acetolactate synthase small subunit	0,44	
spr0414	SP0458		<i>dinP</i>	DNA-damage-inducible protein P		2,78
spr0443	SP0501		<i>glnR</i>	Transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	0,40	4,79
spr0444	SP0502		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase type 1		6,16
spr0445	SP0505		<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme	0,20	0,38
spr0446	SP0507		<i>hsdS</i>	Type I restriction enzyme <i>EcoKI</i> specificity protein (S protein)	5,49	9,24
spr0447	SP0506		<i>xerD</i>	Integrase/recombinase	0,44	
spr0448	SP0508		<i>hsdS</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease chain S	0,21	

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr0453	SP0515		<i>hrcA</i>	Heat inducible transcription repressor		0,30
spr0454	SP0516		<i>grpE</i>	Heat-shock protein (activation of DnaK)		0,25
spr0455	SP0517		<i>dnaK</i>	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)		0,27
spr0457	SP0520		-	Putative methyl-accepting chemotaxis protein		2,27
spr0461	SP0524		<i>blpT</i>	Hypothetical protein	0,18	0,20
spr0462	SP0525		<i>blpS</i>	Regulatory protein	0,42	
spr0463	SP0526		<i>rr13</i>	Response regulator	0,47	0,37
spr0464	SP0527		<i>hk13</i>	Histidine kinase	0,41	
spr0465	SP0528		<i>ip</i>	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type	0,16	0,25
spr0466	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	0,12	0,20
spr0467	SP0529		<i>blpB</i>	Putative BlpC ABC transporter	0,15	0,23
spr0468	SP0042		<i>blpA</i>	Putative BlpC ABC transporter (ATP-binding protein BlpA)	0,09	0,19
spr0469	SP0042		<i>blpA</i>	SpiA protein	0,08	0,21
spr0470	SP0541		-	Putative bacteriocin BlpO	0,19	
spr0472	SP0545		<i>blpY</i>	BlpY protein	0,13	0,22
spr0473	SP0546		<i>blpZ</i>	Putative BlpZ protein (fusion)	0,18	
spr0474	SP0547		<i>pncP</i>	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate	0,10	0,16
spr0504	SP0576		<i>licT</i>	Transcriptional antiterminator (BglG family)	0,31	0,18
spr0505	SP0577		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,28	0,12
spr0506	SP0578		<i>bgIH</i>	6-phospho-beta-glucosidase		0,23
spr0514	SP0585		<i>metE</i>	Tetrahydropteroyltryglutamate methyltransferase		0,36
spr0527	SP0602		<i>pep27</i>	A secreted peptide which is the signal sensed by VncR/S		2,43
spr0528	SP0603		<i>vncR</i>	VncR, response regulator		2,29
spr0529	SP0604		<i>vncS</i>	VncS, histidine kinase		2,43
spr0531	SP0606		-	Putative oxidoreductase	2,05	
spr0542	SP0617		-	Putative fructose-bisphosphate aldolase	3,24	5,44
spr0561	SP0641		<i>prtA</i>	Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA		0,48
spr0579	SP0662		<i>hk09</i>	Histidine kinase		2,17
spr0585	SP0669		<i>thyA</i>	Thymidylate synthase		2,11
spr0593	SP0676		<i>cpsY</i>	Regulatory function on capsule expression		2,10
spr0594	SP0677		-	Conserved hypothetical protein		2,29
spr0596	SP0679		-	Hypothetical protein		2,65
spr0602	SP0687		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - sodium transport	2,30	
spr0618	SP0706		-	Hypothetical protein	2,18	
spr0619	SP0707		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	2,22	
spr0620	SP1394		<i>ABC-SBP-truncation</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate, truncation	3,48	2,56
spr0621	-		<i>ABC-SBP-truncation</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate, truncation	2,28	2,65

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
 spr0622	SP0709		<i>glnQ</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport		3,26
spr0628	SP0716		-	Putative transcriptional regulator		0,50
 spr0629	SP0717		<i>thiM</i>	Hydroxyethylthiazole kinase		0,50
 spr0630	SP0718		<i>thiE</i>	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase		0,37
spr0653	SP0743		-	Putative TetR family transcriptional regulator	2,03	2,14
 spr0654	SP0744		<i>comEB</i>	dCMP deaminase		2,04
 spr0668	SP0758		<i>ptsG</i>	PTS glucose-specific enzyme IIABC component		2,02
 spr0679	SP0771		<i>ppiA</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		2,37
 spr0690	SP0782		-	Putative cytosolic protein	0,47	0,35
 spr0693	SP0785		-	Putative efflux transporter (RND family protein, MFP subunit)	0,46	0,41
spr0695	SP0787		-	Putative ABC-type antimicrobial peptide transport system (permease component)	0,48	0,45
spr0700	SP0792		-	Putative methionyl-tRNA synthetase	0,43	
 spr0707	SP0798		<i>ciaR</i>	Response regulator, transcriptional regulatory protein	3,63	6,43
 spr0708	SP0799		<i>ciaH</i>	Sensor protein CiaH histide kinase	3,24	4,44
spr0726	SP0822		-	Conserved hypothetical protein		2,41
 spr0778	SP0875		<i>fruR</i>	Transcriptional repressor of the fructose operon	0,41	0,30
spr0782	SP0879		-	Putative membrane protein	2,77	
spr0787	-		-	Hypothetical protein		2,13
 spr0794	SP0894		<i>pepXP</i>	Xaa-pro dipeptidyl-peptidase		2,06
 spr0804	SP0904		-	Putative ABC-transporter (substrate-binding protein)		2,52
 spr0816	SP0916		<i>cad</i>	Lysine decarboxylase		0,49
spr0820	SP0919		-	Putative saccharopine dehydrogenase		0,42
spr0821	SP0920		<i>nspC</i>	Carboxynorspermidine decarboxylase	0,49	0,31
 spr0822	SP0921		-	Putative agmatine deiminase		0,37
 spr0823	SP0922		<i>but</i>	Beta-alanine synthase or beta-ureidopropionase		0,45
spr0855	SP0953		-	Putative acetyltransferase (GNAT family protein)		2,19
 spr0856	SP0954		<i>celA</i>	Competence protein	0,28	0,05
spr0857	SP0955		<i>celB</i>	Competence protein	0,23	0,09
spr0858	SP0956		-	Hypothetical protein		0,29
 spr0859	SP0957		-	Putative ABC-transporter (ATP-binding protein)	0,29	0,11
spr0860	SP0958		-	Putative ribosome recycling factor	0,39	
spr0868	SP0966		<i>flpA</i>	Fibronectin-binding protein-like protein A		2,08
spr0877	SP0974		<i>secG</i>	Protein-export membrane protein secG		2,56
 spr0881	SP0978		<i>coiA</i>	Competence protein	0,29	0,06
 spr0882	SP0979		<i>pepB</i>	Group B oligopeptidase	0,44	
 spr0884	SP0981		<i>ppmA</i>	Proteinase maturation protein		3,09
spr0890	SP0987		-	Putative lysozyme M1		2,64

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr0908	SP1004		<i>phtE</i>	Pneumococcal histidine triad protein E precursor	0,36	0,18
spr0914	SP1009		<i>hemH</i>	Ferrochelatase		3,01
spr0915	SP1010		<i>mscL</i>	Large conductance mechano-sensitive ion channel		2,61
spr0932	SP1029		-	Putative 23S rRNA (uracil-5) -methyltransferase RumA		3,04
spr0936	SP1034		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - iron transport	0,38	
spr0959	SP1056		-	Putative chromosome segregation ATPase		11,35
spr0961	-		<i>rffD</i>	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase		5,18
spr0962	-		-	Conserved hypothetical protein		2,25
spr0963	-		-	Hypothetical protein		2,17
spr0964	-		-	Hypothetical protein		2,51
spr0975	SP1069		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate		0,49
spr0976	SP1070		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate	0,36	0,42
spr0996	SP1088		<i>radC</i>	DNA repair protein	0,27	0,07
spr0997	SP1089		-	Putative glutamine amidotransferase, classI		2,15
spr0998	SP1090		-	Putative redox-sensing transcriptional repressor Rex		2,34
spr1000	SP1093		-	Hypothetical protein		2,67
spr1003	SP1096		-	Putative adenylate cyclase		2,19
spr1010	SP1102		-	Conserved hypothetical protein		3,33
spr1022	SP1115		<i>rggD</i>	Transcriptional regulator		2,18
spr1028	SP1119		<i>gapN</i>	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		3,32
spr1037	SP1148		<i>transposase B</i>	Transposase	2,12	
spr1043	SP1155		-	Putative ribosomal biogenesis GTPase		2,15
spr1049	SP1162		<i>acoC</i>	Dihydroliipoamide S-acetyltransferase		0,47
spr1050	SP1163		<i>acoB</i>	TPP-dependent acetoin dehydrogenase beta chain		0,47
spr1051	SP1164		<i>acoA</i>	TPP-dependent acetoin dehydrogenase alpha chain		0,44
spr1056	SP1170		-	Hypothetical protein		2,13
spr1060	SP1174		<i>phpA</i>	Histidine Motif-Containing protein	2,07	
spr1097	SP1215		<i>nirC</i>	Formate-nitrate transporter		3,18
spr1110	SP1230		<i>dfp C-terminus</i>	Similar to C-terminal region of the Dfp protein		2,18
spr1112	SP1232		-	Putative integral membrane protein		2,11
spr1120	SP1241		<i>glnP</i>	ABC transporter membrane spanning permease - glutamine transport		5,81
spr1121	SP1242		<i>glnQ</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport		4,74
spr1122	SP1243		<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase		4,43
spr1128	SP1249		<i>guaC</i>	GMP reductase		0,49
spr1131	SP1252		-	Putative translation factor (SUA5)		2,06
spr1134	SP1256		-	Putative membrane-spanning protein		2,06
spr1135	-		<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase		2,26

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr1137	SP1258		<i>leuA-truncation</i>	2-isopropylmalate synthase, truncation		2,22
spr1139	SP1260		<i>cutC</i>	Copper sensitivity		2,31
spr1143	SP1265		-	Hypothetical protein	0,31	0,42
spr1144	SP1266		<i>smf</i>	DNA processing Smf protein	0,19	0,10
spr1152	SP1274		<i>licD2</i>	licD2 Protein	2,12	
spr1153	SP1275		<i>carB</i>	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit	0,45	0,25
spr1154	SP1276		<i>carA</i>	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit		0,28
spr1155	SP1277		<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase		0,34
spr1156	SP1278		<i>pyrR</i>	Transcriptional attenuation of the pyrimidine operon / uracil phosphoribosyltransferase activity	0,44	0,33
spr1161	SP1282		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	2,22	
spr1162	SP1283		<i>htpX</i>	Heat shock protein		2,62
spr1165	SP1286		<i>pyrP</i>	Uracil permease	0,44	0,27
spr1168	SP1289		-	Putative 50S ribosomal protein L19		2,41
spr1178	SP1300		-	Putative high-affinity Fe ²⁺ /Pb ²⁺ permease		2,16
spr1179	-		-	Putative Dyp-type peroxidase		2,08
spr1184	-		-	Putative transposase		2,33
spr1220	SP1362		<i>mecA</i>	Negative regulator of genetic competence		2,56
spr1239	SP1382		<i>amy</i>	Alpha-amylase precursor		5,02
spr1274	SP0117		<i>spsA-truncation</i>	Choline binding protein		2,08
spr1275	SP1419		-	Putative acetyltransferase (GNAT family protein)		2,12
spr1276	SP1420		<i>nadE</i>	NAD synthetase, ammonia dependent		2,38
spr1289	SP1434		<i>ABC-N/P</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning protein - unknown substrate		0,48
spr1290	SP1435		<i>ABC-N/P</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning protein - unknown substrate		0,50
spr1321	SP1467		-	Putative glutamine amidotransferase subunit PdxT	2,31	5,44
spr1322	SP1468		<i>pdx1</i>	Pyridoxine biosynthesis protein	2,41	5,21
spr1324	SP1470		<i>apbE</i>	Thiamine biosynthesis lipoprotein	2,18	2,00
spr1325	SP1471		-	Putative NADPH-dependent FMN reductase	2,12	2,14
spr1326	SP1472		-	Putative oxidoreductase	2,49	3,24
spr1352	SP1499		<i>bta</i>	Bacterocin transport accessory protein		2,98
spr1356	SP1504		-	Putative TPR domain protein		2,04
spr1378	SP1839		<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation		0,40
spr1379	SP1839		<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation		0,31
spr1380	SP1840		<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation		0,31
spr1381	-		<i>ABC-MSP-truncation</i>	ABC transporter, truncation		0,31
spr1382	SP1527		<i>aliB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport		0,32
spr1383	SP1529		<i>PST transporter</i>	Polysaccharide transporter		2,21
spr1425	SP1567		<i>aldR</i>	Transcription regulator		2,09

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr1427	SP1569		<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (class III heat-shock protein)		2,07
spr1429	SP1571		<i>dfr</i>	Dihydrofolate reductase		2,08
spr1436	SP1578		-	Putative SAM-dependent methyltransferase		0,36
spr1440	SP1586		-	Putative ATP-dependent RNA helicase	0,48	
spr1441	SP1587		<i>oxIT</i>	Major facilitator:Oxalate:Formate Antiporter		0,23
spr1445	SP1591		<i>pepQ</i>	Dipeptidase		2,53
spr1449	SP1597		-	Putative pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase		2,71
spr1451	SP1599		<i>truA</i>	tRNA pseudouridine synthase A		2,55
spr1460	SP1607		<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase		2,21
spr1462	SP1609		-	Putative NIF3 (NGG1p interacting factor 3) family protein	2,05	
spr1469	SP1628		-	Hypothetical protein		2,28
spr1473	SP1632		<i>hk01</i>	Histidine kinase	2,56	2,70
spr1474	SP1633		<i>rr01</i>	Response regulator		2,08
spr1491	SP1647		<i>pepO</i>	Endopeptidase O		2,22
spr1515	SP1671		<i>ddl</i>	D-alanine-D-alanine ligase		2,49
spr1518	SP1674		-	Putative phosphosugar-binding transcriptional regulator		2,15
spr1536	SP1326		<i>nanA</i>	Sialidase A precursor (neuraminidase A)	2,32	2,84
spr1537	SP1694		-	Hypothetical protein		2,89
spr1538	SP1695		<i>axe1</i>	Xylan esterase 1	4,24	
spr1548	SP1706		-	Putative membrane protein		0,45
spr1549	-		-	Putative exported protein		0,39
spr1561	SP1716		<i>natB</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Na+ export		0,44
spr1562	SP1717		<i>natA</i>	ABC transporter ATP-binding protein - Na+ export		0,42
spr1572	SP1728		-	Hypothetical protein		2,09
spr1574	SP1927		<i>IS1381-truncation</i>	Degenerate transposase (orf1)		2,04
spr1625	SP1804		-	Putative general stress protein 24		2,69
spr1628	SP1808		<i>piID</i>	Type 4 prepilin peptidase		0,08
spr1629	SP1809		-	Putative transcriptional regulator		0,46
spr1630	SP1810		-	Hypothetical protein		0,39
spr1641	SP1823		<i>mgtC</i>	Mg(2+) transport ATPase/permease	2,88	0,34
spr1642	-		-	Hypothetical protein	2,07	
spr1643	SP1824		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate		0,27
spr1644	SP1825		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate		0,32
spr1645	SP1826		<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate		0,36
spr1656	SP1839		<i>ABC-N/P</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate		2,26
spr1662	SP1847		<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosyltransferase		0,45
spr1663	SP1848		<i>pbuX</i>	Nucleobase:cation symporter for xanthine	0,26	0,16

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr1669	SP1854		<i>galR</i>	GalR, member of GalR-LacI family of transcriptional regulators, binds DNA; regulator of gal operon	2,46	
spr1670	SP1855		<i>adhB</i>	Alcohol dehydrogenase	2,06	2,34
spr1671	SP1856		-	Putative MerR family transcriptional regulator	2,37	2,11
spr1677	SP1860		<i>proWX</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - choline transporter	2,66	2,42
spr1678	SP1861		<i>proV</i>	ABC transporter ATP-binding protein - choline transporter		2,39
spr1679	SP1862		-	Hypothetical protein	2,20	
spr1681	SP1864		-	Putative bacteriocin		2,16
spr1684	SP1869		<i>fatD</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport		0,28
spr1687	SP1872		<i>fatB</i>	ABC transporter substrate-binding protein - ferric iron transport		0,17
spr1706	SP1890		<i>amiC</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - oligopeptide transport		0,49
spr1709	SP1894		<i>gtfA</i>	Dextranucrase (sucrose 6-glucosyltransferase)	2,31	
spr1719	SP1903		-	Putative cytosolic protein		2,12
spr1722	SP1906		<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL		0,26
spr1723	SP1907		<i>groES</i>	Cochaperonin GroES		0,22
spr1732	SP1916		-	Putative PAP2 family protein		0,44
spr1744	SP1310		<i>ISI381-truncation</i>	Degenerate transposase (orf1)		2,58
spr1751	SP1935		-	Hypothetical protein		0,49
spr1754	SP1937		<i>lytA</i>	Autolysin (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)		0,48
spr1755	-		-	Hypothetical protein		0,44
spr1756	SP1939		<i>dinF</i>	DNA-damage-inducible protein		0,15
spr1757	SP1940		<i>recA</i>	DNA recombination/repair		0,14
spr1758	SP1941		<i>cinA</i>	Competence induced protein		0,08
spr1760	SP1943		-	Putative acetyltransferase	2,09	
spr1761	SP1944		-	Putative P-loop hydrolase	2,08	
spr1762	SP1945		-	Putative lipoprotein	2,09	0,10
spr1767	SP1950		<i>cylM</i>	CylM protein, cytolytic toxin system		0,33
spr1768	SP1951		-	Hypothetical protein		0,50
spr1769	SP1952		-	Putative lipoprotein		0,39
spr1770	SP1953		<i>clyB</i>	ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein		0,43
spr1787	SP1972		-	Putative membrane protein	2,67	2,91
spr1794	SP1980		<i>cbf1</i>	Cmp-binding-factor 1	2,16	
spr1812	SP1998		<i>ansB</i>	L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase)		2,41
spr1819	SP2006		<i>comX2</i>	Competence-specific global transcription modulator		0,03
spr1824	SP2011		<i>rluD</i>	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D		2,42
spr1826	SP2013		-	Putative efflux ABC transporter (permease protein)		0,47
spr1829	SP2016		<i>nadC</i>	Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase		0,11
spr1830	SP2017		-	Putative membrane protein		0,33

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr1833	SP2021		<i>bgl2</i>	Beta-glucosidase	0,45	0,28
spr1834	SP2022		<i>ptcC</i>	Phosphotransferase system system, cellobiose-specific IIC component		0,30
spr1835	SP2023		<i>ptcB</i>	Phosphotransferase system system, cellobiose-specific IIB component		0,29
spr1837	SP2026		<i>adhE</i>	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase		2,07
spr1856	-		-	Putative methyltransferase small domain superfamily		0,03
spr1857	-		-	Putative methyltransferase small domain superfamily		0,21
spr1859	SP2048		-	Putative competence protein ComGF		0,01
spr1862	SP2051		<i>cglC</i>	Competence protein		0,01
spr1864	SP2053		<i>cglA</i>	Competence protein		0,06
spr1884	SP2072		<i>guaA</i>	Glutamine amidotransferase	0,33	0,25
spr1889	SP2077		<i>argR</i>	Arginine repressor	2,45	
spr1913	SP2103		<i>rrmA</i>	23S rRNA m1G745 methyltransferase		2,03
spr1915	SP2105		-	Putative membrane protein	2,49	
spr1916	SP2106		<i>malP</i>	Maltodextrin phosphorylase	5,08	10,94
spr1917	SP2107		<i>malM</i>	4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase)	3,91	5,88
spr1934	SP2125		-	Putative metal-sulfur cluster biosynthetic protein		2,17
spr1936	SP2127		<i>tkc</i>	Putative transketolase c-terminal section	0,31	
spr1937	SP2128		<i>tkn</i>	Putative transketolase n-terminal section	0,30	
spr1938	SP2129		-	Putative ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	0,31	
spr1939	SP2130		-	Putative PTS system (IIB component)	0,32	
spr1940	SP2131		-	Putative transcriptional regulator (BglG family protein)	0,30	
spr1956	SP2148		<i>arcA-truncation</i>	Arginine deiminase, truncation		0,47
spr1959	SP2152		-	Putative C4-dicarboxylate anaerobic carrier protein		0,34
spr1960	SP2153		-	Putative peptidase family M20/M25/M40 protein		0,42
spr1966	SP2160		-	Putative large secreted protein		0,49
spr1967	SP2161		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		0,37
spr1968	SP2162		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,43	0,31
spr1969	SP2163		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		0,42
spr1970	SP2164		<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component		0,41
spr1971	SP2165		<i>fucU</i>	Fucose pathway protein, function unknown		0,35
spr1972	SP2166		<i>fucA</i>	L-fucose phosphate aldolase		0,36
spr1973	SP2167		<i>fcsK</i>	Fucose kinase	0,36	0,24
spr1979	SP2173		<i>dltD</i>	D-alanine transfer from undecaprenol-phosphate to the poly(glycerophosphate) chain	3,86	4,97
spr1980	SP2174		<i>dltC</i>	D-alanyl carrier protein	3,73	6,76
spr1981	SP2175		<i>dltB</i>	D-alanine transfer from Dep to undecaprenol-phosphate	3,01	7,35
spr1982	SP2176		<i>dltA</i>	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	4,69	5,88
spr1987	SP2183		-	ORF3	0,07	0,14

Gennummer R6	Gennummer TIGR4	Lage des intergenen Bereichs	Genname	Funktion des Genprodukts	Transkriptmengenverhältnis Mutante/R6	
					C202	C402
spr1988	SP2184		<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	0,05	0,02
spr1989	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,06	0,04
spr1990	SP2185		<i>glpD-truncation</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation	0,04	0,03
spr1991	SP2186		<i>glpK</i>	Glycerol kinase	0,04	0,03
spr1998	SP2193		<i>rr06</i>	Response regulator		0,50
spr2002	SP2196		<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - anion transport		0,31
spr2003	SP2197		-	Putative ABC-transporter (substrate-binding protein)		0,36
spr2004	SP2198		<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate		0,41
spr2005	SP2199		-	Conserved hypothetical protein		0,45
spr2006	SP2201		<i>cbpD</i>	Choline binding protein D	0,39	0,12
spr2012	SP2207		<i>comFC</i>	Involved in transformation (competence for DNA uptake)	0,42	
spr2013	SP2208		<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases	0,40	
spr2033	SP2228		<i>imdH</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase		2,18
spr2042	SP2236		<i>comD</i>	Histidine protein kinase		0,04
spr2043	SP2237		<i>comC</i>	Competence stimulating peptide precursor (CSP)	0,50	0,06
spr2046	SP2240		<i>spoJ</i>	Chromosome segregation protein	4,42	6,96
rvv13						2,47

An dieser Stelle ist Platz für ein Dankeschön ...

an alle, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt, und somit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die herzliche Aufnahme in der Abteilung, die Ermöglichung meiner Doktorarbeit, die wissenschaftliche und auch menschliche Betreuung, ihr stets großes Interesse am Verlauf dieser Arbeit und die nie ermüdende Begeisterungsfähigkeit und Aufmunterung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. John Cullum für die Zweitkorrektur dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Waldemar Vollmer und seiner Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit bei der Zellwand-Analyse.

Ein herzlicher Dank sei Dalia ausgesprochen für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, ständige Hilfsbereitschaft und zahlreichen Ratschläge. Aber auch dafür, dass sie es fast drei Jahre mit mir in einem Büro ausgehalten hat (oder war es umgekehrt?) und wir viele auch nicht-wissenschaftliche Gespräche führen durften.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für die Unterstützung, Kollegialität und das angenehme Arbeitsklima. Besonders sei Ulrike Klein, Brigitte Rosenberg und Brigitte Schlegler gedankt, ohne deren Hilfe die Laborarbeit kaum möglich gewesen wäre und die mit ihrer stets guten Laune den Laboralltag aufheitern.

Ein großes Danke geht an meine Freundinnen, Freunde und Wegbegleiter der letzten Jahre, allen voran: Yvonne, Mirza, Katya, Michèle, Katharina, Patrick, Linda, Tobias und Georg, die mich ständig aufgemuntert und immer wieder gezeigt haben, dass es auch noch eine Welt außerhalb des Labors gibt. Danke für die vielen lustigen Stunden und den wunderbaren Sommer 2008! Ohne Euch hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht!

Besonders Dir, Yvonne, danke ich für die schöne Zeit, für die unzähligen Dinge, die wir gemeinsam erlebt haben und das kooperative Durchhaltevermögen, wenn wir mal wieder in einer „Story“ waren, in die wieder nur wir geraten konnten.

Danke Jo im fernen Berlin. Kopf hoch, Du hast es auch bald geschafft!

Ein ganz spezielles Dankeschön sende ich Michael auf seine Insel für die Beantwortung nerviger Microarray-Auswertungs-Fragen (Ich ermüde immer noch bei dem Wort Statistik!), die „Happy Heatmaps“, den intensiven E-Mail-Austausch und natürlich den gemeinsamen Abend mit Michèle, an dem wir das Leben mal von einer ganz anderen Seite kennengelernt haben!

Ohne meine Eltern wäre ich nie dort, wo ich jetzt bin. Danke für die immerwährende Unterstützung und Aufmunterung gerade im letzten Abschnitt meiner Doktorarbeit.

Dankeschön Isabel, für das geduldige Zuhören und die konstruktive Kritik. Und natürlich für das Überlebenspaket!

Ein riesengroßes Dankeschön gebührt Dir, Marko, für Dein liebevolles Verständnis, Deine Geduld und den Rückhalt. Für die vielen Stunden in den letzten Jahren, die ich mit der „Uni“ und nicht mit Dir verbracht habe.

Ach, und nicht zu vergessen: Ein Herz für Pneumos! Dank an Achim, Peter und Gerd(i), die Hauptakteure dieser Arbeit, die alles geduldig über sich ergehen haben lassen!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ilka Miriam Zerfaß
Anschrift: Kurt-Schumacher-Straße 32
67663 Kaiserslautern
Geburtsdatum: 21.01.1981
Geburtsort: Trier
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1987 – 1991 Grundschule in Waldrach
1991 – 2000 Bischöfliches Angela-Merici-Gymnasium in Trier
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

10/2000 – 10/2005 Studium der Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abschluss: Diplom
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Pflanzenphysiologie, Biochemie
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck mit dem Thema: „Die Rolle von PBP1a bei der Entwicklung von β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*“
seit 11/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck

Publikationen

Maurer P., Koch B., Zerfaß I., Krauß J., van der Linden M., Frère J.-M., Contreras-Martel C., Hakenbeck R. (2008): Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: Three new mutational pathways for remodelling an essential enzyme into a resistance determinant. *J Mol Biol* **376**(5): 1403-1416.

Zerfaß I., Hakenbeck R., Denapaité D. (2009): An important site in PBP2x of penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Mutational analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(3): 1107-1115.