# β-Laktam-Resistenz in *Streptococcus* spp.: Eine neue Resistenzdeterminante *murE*

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

von

## Dipl.-Biol. Katya Todorova

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 20.12.2010

Vorsitzender der Prüfungskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

- 1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck
  - 2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2010

D386

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 erkläre ich, Katya Todorova, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 03.11.2010

# I Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	12
1.1 Die Gattung Streptococcus	13
1.1.1 Allgemeine Merkmale	13
1.1.2 Klassifizierung	13
1.1.3 S. pneumoniae	14
1.1.4 S. oralis	15
1.1.5 Peptidoglykan und Peptidoglykanbiosynthese	15
1.2 Penicillin-bindende Proteine (PBPs)	17
1.2.1 $\beta$ -Laktamantibiotika und PBP-vermittelte $\beta$ -Laktam-Resistenz	20
1.3 Entstehung und Ausbreitung der PBP-vermittelten $\beta$ -Laktam-Resistenz in	
S. pneumoniae	23
1.3.1 Natürliche Kompetenz in <i>S. pneumoniae</i>	23
1.3.2 Evolution und Ausbreitung der $\beta$ -Laktam-Resistenz durch horizontalem	
Gentransfer	24
1.4 Nicht-PBP-vermittelte β-Laktam-Resistenz in <i>S. pneumoniae</i>	26
1.5 MurE: Eine Aminosäure-Ligase in der Peptidoglykanbiosynthese	27
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Bakterienstämme	30
2.2 Plasmide	31
2.3 Oligonukleotide	33
2.4 Nährmedien	35
2.4.1 Nährmedien zur Anzucht von S. pneumoniae	35
2.4.2 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	37
2.5 Antibiotika	38
2.6 Mikrobiologische Methoden	38
2.6.1 Anzucht und Wachstum von <i>E. coli</i>	38
2.6.2 Stammkonservierung von <i>E. coli</i>	
2.6.3 Transformation von <i>E. coli</i>	
2.6.4 Anzucht und Wachstum von S. pneumoniae und S. oralis	40
2.6.5 Stammkonservierung von S. pneumoniae und S. oralis	41
2.6.6 Transformation von S. pneumoniae	41
2.6.7 Mikroskopie	42
2.6.8 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	42
2.7 Molekularbiologische Methoden	43

2.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus S. pneumoniae	43
2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus S. oralis	45
2.7.3 Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	45
2.7.4 Plasmid-Midi-Präparation aus <i>E. coli</i>	46
2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese	46
2.7.6 DNA-Elution aus Agarosegelen	47
2.7.7 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	47
2.7.8 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	49
2.7.9 Quantifizierung von DNA	50
2.7.10 DNA-Sequenzierung	50
2.7.11 Enzymreaktionen mit DNA	51
2.8 Biochemische Methoden	52
2.8.1 Herstellung von Zelllysaten und Markierung von Penicillin-bindenden P	roteinen .52
2.8.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.8.3 Herstellung von SDS-Gelen	54
2.8.4 Färbung der SDS-Gele mittels Coomassie-Färbung	55
2.8.5 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot	56
2.9 Bestimmung von Promotor-Aktivitäten	58
2.9.1 Das Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPP2	58
2.9.2 β-Galaktosidaseassay	60
2.10 Herstellung einer ektopischen <i>murE</i> -Kopie und anschließende Deleti	on des
Wildtyp- <i>murE</i>	62
2.11 DNA- Microarray	67
2.11.1 Das Streptococcus pneumoniae R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set	68
2.11.2 Labeling genomischer DNA	69
2.11.3 Spotten der Slides	70
2.11.4 Hybridisieren	71
2.11.5 Scannen der hybridisierten Slides	72
2.11.6 Auswertung der Microarray-Daten	73
2.12 Präparation und Analyse von Pneumokokken-Zellwand	74
2.12.1 Herstellung der Zelllysate zur Isolierung der Zellwand	75
2.12.2 Isolierung der Zellwand und Muropeptide	76
2.12.3 Analytische Trennung der Muropeptide in der HPLC	77
2.12.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Muropeptide von S. oralis	s Uo578
2.13 Bezugsquellen	78
2.14 Computergestützte Datenverarbeitung, -analyse und -abfrage	79
3 Ergebnisse	80

3.1 Charakterisierung von S. oralis Uo5	80
3.1.1 β-Laktam-Resistenz von <i>S. oralis</i> Uo5	80
3.1.2 Morphologie der Streptokokken-Stämme	82
3.1.3 Wachstumsverhalten von <i>S. pneumoniae</i> R6 und <i>S. oralis</i> Uo5	82
3.2 Transfer von pbp2x aus S. oralis Uo5 in S. pneumoniae R6	83
3.2.1 Transformation von S. pneumoniae R6 unter Oxacillinselektion	84
3.2.2 Transformation von S. pneumoniae R6 unter Piperacillinselektion	86
3.2.3 Übertragung von amplifiziertem pbp2x aus S. oralis Uo5 in S. pneumoniae R6	88
3.2.4 Sequenzierung von <i>pbp2x</i> und Bestimmung der Rekombinationsstellen	91
3.2.5 MHK-Vergleich der drei <i>pbp2x</i> -Transformanten	93
3.3 Transfer von <i>pbp1a</i> aus <i>S. oralis</i> Uo5	94
3.4 Transfer von <i>pbp2b</i> aus S. oralis Uo5	98
3.4.1 Übertragung von pbp2b aus S. oralis Uo5 mittels Transformation	
chromosomaler DNA	98
3.4.2 PBP2b aus S. oralis Uo5 als primäre Resistenzdeterminante	103
3.4.3 Beitrag von PBP2b in der $\beta$ -Laktam-Resistenz von S. oralis Uo5 in	
Verbindung mit Mosaik-PBP2x	103
3.5 murE und die $\beta$ -Laktam-Resistenz	106
3.5.1 DNA-Microarray der Transformante P20	106
3.5.2 Sequenzierung von murE in P20 und Bestimmung der Rekombinationsstellen	109
3.5.3 Austausche in <i>murE</i> in den P-Transformanten	109
3.5.4 Beitrag von <i>murE</i> in der $\beta$ -Laktam-Resistenz	112
3.5.5 Sequenzanalyse der Promotorregion von <i>murE</i>	115
3.5.6 Aktivität der murE- Promotoren aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	116
3.5.7 Herstellung einer ektopischen murE-Kopie mit unterschiedlichen Promotor-	
Gen-Fusionskonstrukten	118
3.5.8 Transfer von <i>murE<sup>MS</sup></i> aus <i>S. oralis</i> Uo5	120
3.5.9 Sequenzvergleich von <i>murE</i> in anderen Streptokokken	122
3.5.10 Expression von <i>pbp2x</i> in den <i>murE</i> -Transformanten	125
3.5.11 Einfluss des S. oralis-murE auf die Resistenz in Verbindung mit	
S. oralis-pbp2b	129
3.5.12 Einfluss des S. oralis-murE auf die Resistenz in Verbindung mit	
ausgetauschten <i>pbp2b</i> und <i>pbp2x</i>	130
3.5.13 Untersuchung möglicher Auswirkungen von murE auf die Zellwand-	
Zusammensetzung	131
3.6 Übertragung weiterer Resistenzdeterminanten mittels Transformation	
chromosomaler S. oralis Uo5-DNA	135

4 Diskussion	142
4.1 Übertragung der β-Laktam-Resistenz von <i>S. oralis</i> auf <i>S. pneumoniae</i>	142
4.1.1 <i>S. oralis</i> PBP2x und die β-Laktam-Resistenz	142
4.1.2 <i>S. oralis</i> PBP1a und die β-Laktam-Resistenz	144
4.1.3 <i>S. oralis</i> PBP2b und die β-Laktam-Resistenz	146
4.1.4 Übertragung weiterer Resistenzdeterminanten	148
4.2 MurE: Eine neue Resistenzdeterminante	150
4.2.1 β-Laktam-Resistenz, hervorgerufen durch verändertes MurE	150
4.2.2 Suche nach resistenzrelevante Mutationen in <i>murE</i>	153
4.3 Ausblick	156
5 Zusammenfassung	158
6 Literaturverzeichnis	160
7 Anhang	178

# II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Peptidoglykanbiosynthese in S. pneumoniae	17
Abb. 1.2: Grundstruktur des Peptidoglykans in S. pneumoniae und die von PBPs	
katalysierten Reaktionen	18
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der PBPs von S. pneumoniae	19
Abb. 1.4: Grundstruktur der Penicilline (A) und Cephalosporine (B)	21
Abb. 1.5: Regulation der genetischen Kompetenz in S. pneumoniae	24
Abb. 1.6: Modell zur Entstehung resistenzrelevanter Mosaikgene in S. pneumoniae	26
Abb. 2.1: Aufbau des Western-Blots	57
Abb. 2.2: Genetische Organisation des Promotor Probe Plasmids pPP2 und dessen	
Integration in das Genom von S. pneumoniae.	59
Abb. 2.3: Genetische Organisation des Integrationsplasmids pSW1 und dessen	
Integration in das Genom von S. pneumoniae.	63
Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Herstellung von pSW1+PR6murEUo5	64
Abb. 2.5: Herstellung einer ektopischen Kopie von murE	65
Abb. 2.6: Herstellung eines murE-Inaktivierungsderivats	66
Abb. 2.7: Herstellung des Stammes O(2x)RUAmurE	67
Abb. 2.8: Verlauf eines DNA-Microarrays	68
Abb. 3.1: Mikroskopische Aufnahme von S. pneumoniae R6 (A) und S. oralis Uo5 (B)	82
Abb. 3.2: Wachstumsverhalten von S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	83
Abb. 3.3: PBP-Profile der Oxacillin-selektionierten R6-Transformanten	85
Abb. 3.4: PBP-Profile der Piperacillin-selektionierten R6-Transformanten	87
Abb. 3.5: PBP-Profile der O(2x)-Transformanten	90
Abb. 3.6: Vergleich von PBP2x aus S. pneumoniae R6, S. oralis Uo5 und	
S. pneumoniae 2349	91
Abb. 3.7: Rekombinationsstellen von pbp2x aus S. oralis Uo5 in den R6-Transformante	en93
Abb. 3.8: PBP-Profile der PC-Transformanten	95
Abb. 3.9: Rekombinationsstellen von <i>pbp1a</i> aus <i>S. oralis</i> Uo5 in den PC1- und PC3-	
Transformanten	96
Abb. 3.10: Proteinvergleich von PBP1a aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	97
Abb. 3.11: PBP-Profile der PCP-Transformanten	99
Abb. 3.12: Rekombinationsstellen von <i>pbp2b</i> aus <i>S. oralis</i> Uo5 in der Transformante	
PCP7	101
Abb. 3.13: Proteinvergleich von PBP2b aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	102
Abb. 3.14: PBP-Profile der OP-Transformanten	104
Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Rekombinationsstellen von pbp2b in den	
Transformanten P(2b) und OP(2x/2b)	105
Abb. 3.16: Abschnitt der genetischen Organisation der Gene spr1383-spr1387 in	
S. pneumoniae R6	108
Abb. 3.17: Rekombinationsstellen von murE aus S. oralis Uo5 in P20	109
Abb. 3.18: Sequenzvergleich von murE in ausgewählten P-Transformanten,	
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	110
Abb. 3.19: Proteinvergleich von MurE aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	111
Abb. 3.20: Unterschiedliche murE-Fragmente, die zur Transformation von S. p. R6	
eingesetzt wurden	113
Abb. 3.21: Vergleich der Promotorregion von murE aus S. pneumoniae R6 und	
S. oralis Uo5	116

Abb. 3.22: Promotoraktivität der <i>murE</i> -Promotoren aus <i>S. pneumoniae</i> R6 und <i>S. oralis</i> Uo5	117
Abb. 3.23: Zur Transformation eingesetztes Fragment, das einen zentralen Teil	120
Abb. 3.24: Proteinvergleich von MurE aus den Stämmen OP(2x/murE <sup>MS</sup> )4, OP(2x/murE <sup>MS</sup> ) S preumoniae R6 und S oralis Uo5 und des Fragmentes murE <sup>MS</sup>	<sup>IS</sup> )5, 122
Abb. 3.25: Sequenzvergleich der Promotorregion von <i>murE</i> in verschiedenen	
Streptokokken-Isolaten	123
Abb. 3.26: Vergleich der Proteinsequenz von MurE in verschiedenen Streptokokken	124
Abb. 3.27: Immunodetektion von PBP1a und PBP2b	126
Abb. 3.28: Immunodetektion von PBP2x	127
Abb. 3.29: Aktivität des <i>pbp2x</i> -Promotors in Stämmen mit unterschiedlichen Promotor-	
Gen-Fusionen von <i>murE</i>	128
Abb. 3.30: PBP-Profile der PP(murE/2b)-Transformanten	129
Abb. 3.31: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am	
Gesamtpeptidmaterial	132
Abb. 3.32: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus	
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	133
Abb. 3.33: Ablauf der in dieser Arbeit durchgeführten S. oralis Uo5	
DNA-Transformationen	136
Abb. 3.34: PBP-Profile der Transformanten aus den einzelnen Transformationsstufen	138
Abb. 4.1: 3D-Struktur von MurE aus E. coli	154
Abb. 4.2: Ausschnitt der 3D-Struktur von MurE aus <i>E. coli</i> in Komplex mit dem Substrat UDP-NAc-I -Ala-D-Glu	155
Abb. 7.1: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus	170
Abb. 7.2: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein	. 170
Abb. 7.3: Strukturen der in der Zellwand von R6, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) detektierten Muropentide	180
Abb. 7.4: Strukturen der in der Zellwand von R6. R6(murF), R6(2x), R62xmurF und	
R6(2x/murE) detektierten Muropeptide	
Abb. 7.5: Strukturen der in der Zellwand von R6. R6(murE). R6(2x). R62xmurE und	
R6(2x/murE) detektierten Muropeptide	182
. ,	

# III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Ausgangs-Streptokokken-Stämme	30
Tab. 2.2: Konstruierte Derivate von S. pneumoniae	30
Tab. 2.3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	31
Tab. 2.4: Verwendete Plasmide	32
Tab. 2.5: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von pbp1a au	IS
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	33
Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von pbp2x au	IS
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	
Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von pbp2b au	IS
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	
Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von murE aus	3
S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5	
Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>ciaH</i> aus	
S. pneumoniae R6	
Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Seguenzierung von <i>cpoA</i> au	IS
S. pneumoniae R6	
Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Herstellung einer ektopischen Kopie von <i>murE</i>	=
Tab. 2.12: Oligonukleotide für die Inaktivierung von <i>murE</i>	
Tab. 2.13: Oligonukleotide zum überprüfen der MCS in pSW1	
Tab. 2 14 <sup>.</sup> Oligonukleotide für die Klonierung der Promotorregionen von <i>murl</i>	Faus
S. oralis Uo5 und S. pneumoniae R6 in pPP2	
Tab. 2 15. Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierungen in pPP2, sowie	zur Bestätigung
der korrekten Integration in das Genom von S. pneumoniae R6	
Tab. 2.16: Zusammensetzung des C-Mediums	
Tab. 2.17: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums	
Tab. 2.18: Zusammensetzung von D-Agar	
Tab. 2.19: Zusammensetzung LB-Medium	
Tab. 2.20: Zusammensetzung LB-Agar	
Tab. 2 21: Verwendete Antibiotika	38
Tab. 2.22 <sup>o</sup> Zur Transformation von <i>E. coli</i> eingesetzte Lösungen	40
Tab 2 23: Getestete E-Teststreifen zur Bestimmung der MHK	43
Tab. 2.24: Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus S. pneumoniae	<u>4</u>
Tab. 2.25: Verwendete Lösungen zur Plasmidisolierung	46
Tab. 2.26: Verwendete Essengen zur Fidemidisenerung	
Tab. 2.27: Reaktionsansatz der GoldStar™ DNA-Polymerase	48
Tab. 2.28: PCR-Programm der GoldStar™ DNA-Polymerase	48
Tab. 2.20: Reaktionsansatz der iProof High Fidelity Polymerase	40 49
Tab. 2.30: PCR-Programm der iProof High Fidelity Polymerase	40- 10
Tab. 2.31: Ligationsansatz	
Tab. 2.31. Ligationsansatz	
Tab. 2.32: Ansatzschama für ein kleines Trenngel	
Tab. 2.30. Ansatzschema für ein kleines Sammeldel	
Tab. 2.35: Zusammansetzung der Tranngolo zur Auftrannung von Zollwester	
Tab. 2.36: Verwendete Duffer für die SDS-Cololaktropharasa	۲
Tab. 2.30. Verwendete Funer für Une SDS-Geleiektropholese	
Tab. 2.37. LUSUNGEN und Duffer zur Durchführung des 9. Calakteridessesses	۵۵
Tab. 2.30. Losungen und Puller zur Durchlunfung des IS-Galaktosidaseassay	/562

Tab. 2.39: Spotting Protokoll der ScanArraySoftware	71
Tab. 2.40: Einstellungen des verwendeten Hybridisierungsprotokolls	72
Tab. 2.41: Lösungen und Puffer für die Microarray-Hybridisierung	72
Tab. 3.1: Einteilung der Penicillin-Resistenz	81
Tab. 3.2: MHK-Werte für S. oralis Uo5	81
Tab. 3.3: Selektion der O-Transformanten	85
Tab. 3.4: β-Laktam-Resistenz der O-Transformanten	86
Tab. 3.5: Selektion der P-Transformanten	87
Tab. 3.6: β-Laktam-Resistenz der P-Transformanten	88
Tab. 3.7: Selektion der O(2x)-Transformanten	89
Tab. 3.8: MHK-Werte für Oxacillin der O(2x)-Transformanten	90
Tab. 3.9: MHK-Vergleich der drei pbp2x-Transformanten	93
Tab. 3.10: MHK-Werte für Cefotaxim der Transformanten PC1-PC12	95
Tab. 3.11: Selektion der PCP-Transformanten	98
Tab. 3.12: β-Laktam-Resistenz der PCP-Transformanten	100
Tab. 3.13: MHK-Vergleich der Transformanten mit Mosaik-PBP2x und/oder - PBP2b	106
Tab. 3.14: Signifikante Gene der DNA-Microarray-Analyse von S.p. R6 – P20 auf	
R6/TIGR-Chip	107
Tab. 3.15: Selektion der P(murE), P(murE*) und P(murE**)-Transformanten	114
Tab. 3.16: Austausch von murE in P(murE)-, P(murE*)- und P(murE**)-Transformanten	115
Tab. 3.17: MHK-Werte der Stämme mit ektopischen murE-Promotor-Fusionskonstrukten	
im Vergleich zum Rezipient O(2x)8 und der Transformante P20	119
Tab. 3.18: Selektion der OP(2x/murE <sup>MS</sup> )-Transformanten	121
Tab. 3.19: MHK-Vergleich der Transformanten mit Austausch von MurE alleine, und in	
Verbindung mit Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b	130
Tab. 3.20: Quantifizierung und Massenspektrometrie-Analyse der HPLC-aufgetrennten	
S. oralis Uo5-Muropeptide	134
Tab. 3.21: Molekulare Massen von nicht-reduzierten S. oralis Uo5-Muropeptide, detektiert	t
mittels micro-HPLC-LTQ-FT Massenspektrometrie	134
Tab. 3.22: Selektion der Transformanten der Transformationsstufen vier bis sechs	137
Tab. 3.23: β-Laktam-Resistenz der Transformanten, erhalten durch sukzessive	
Transformation chromosomaler Uo5-DNA	139
Tab. 3.24: Durch DNA-Microarray erfasste ausgetauschte Gene in den Transformanten	140
Tab. 4.1: MHK-Vergleich der Transformanten mit Austausch von MurE alleine, und in	
Verbindung mit Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b	151
Tab. 7.1: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am	
Gesamtpeptidmaterial	183

# IV Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid	
Abb.	Abbildung	
ad	auf	
ADP	Adenosindiphosphat	
Ala	Alanin	
AMP	Adenosinmonophosphat	
APS	Ammoniumpersulfat	
AS	Aminosäure(n)	
ATP	Adenosintriphosphat	
ВАА	Bisacrylamid	
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	
bp	Basenpaar	
BSA	Bovine Serum Albumine	
C	Cefotaxim	
cfu	colony forming units	
CSP	Competence Stimulating Peptide	
Cv3	Cvanin-3	
Cv5	Cvanin-5	
C-Terminus	Carboxy-Terminus	
dATP	Desoxvadenosintriphosphat	
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtrinhosphat	
deAc	deacetyliert	
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DNase	Desoxyribonuklease	
	Desoxyribonukleotidtriphosphat	
dTTP	Desoxythmidintriphosphat	
E. coli	Escherichia coli	
E. faecalis	Enterococcus faecalis	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
ERG	Eppendorf Reaktions-Gefäß	
et al.	et alia (und andere)	
EtOH	Ethanol	
q	SI Erdbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )	
Ğ	N-Acetvlalukosamin	
GlcNAc	N-Acetylglukosamin	
GTP	Guanosintriphosphat	
h	hour (Stunde)	
hmw	high molecular weight	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
IMP	Inosinmonophosphat	
IPTG	Isopropyl-6-D-Thiogalactopyranosid	
kb	Kilobasenpaare	
kDa	Kilodalton	
konz.	konzentriert	

L	Liter		
lmw	low molecular weight		
Μ	N-Acetylmuraminsäure		
mAU	milli Absorbance Units		
MCS	Multiple Cloning Site		
mg	Milligramm		
МНК	Minimale Hemmkonzentration		
min	Minuten		
ml	Milliliter		
mol%	Molprozent		
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure		
MurNAc	N-Acetvlmuraminsäure		
N	Nephelo-Finheit(en)		
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid		
	Nanogramm		
nm	Nanometer		
Nr	Nummer		
N Torminuc			
	nicht quazöhlbar		
0			
0			
OAC	O-acelylien		
	Oplische Dichte		
	o-initrophenol		
UNPG	o-initrophenoi-β-D-Galactopyranosid		
P	Piperacillin		
p.a.	per analysi		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PASTA	PBP and Serin/Threonine Kinase Associated		
PBP	Penicillin-bindendes Protein		
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
pmol	Picomol		
pPP	Pneumo Promoter Probe		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
R	resistent		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNase	Ribonuklease		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
S	sensitiv		
S*	Aktives Serin		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
S. agalactiae	Streptococcus agalactiae		
S. aureus	Staphylococcus aureus		
S. m.	Streptococcus mitis		
S. mitis	Streptococcus mitis		

S. mutans	Streptococcus mutans		
S. o.	Streptococcus oralis		
S. oralis	Streptococcus oralis		
S. p.	Streptococcus pneumoniae		
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae		
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes		
S. sanguis	Streptococcus sanguis		
Spc	Spektinomycin		
SSC	Saline Sodium Citrate		
Str	Streptomycin		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TE	Tris-EDTA		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
Tet	Tetracyclin		
T <sub>m</sub>	Melting Temperature		
Tmp	Trimethoprim		
U	Unit		
UDP	Uridindiphosphat		
UMP	Uridinmonophosphat		
UV	Ultraviolett		
üN	über Nacht		
V	Volt		
v/v	volume/volume		
vergl.	vergleiche		
z.B.	zum Beispiel		

# 1. Einleitung

Die zufällige Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 war eine der wichtigsten Ereignisse in der Geschichte der Medizin. Mit dem Einzug des Penicillins war es möglich, eine Vielzahl gefährlicher Infektionskrankheiten zu bekämpfen. Der breite und unkontrollierte Konsum von β-Laktamantibiotika führte jedoch dazu, dass bereits wenige Jahre später die ersten Resistenzen auftraten, ein Problem, das sich schnell weltweit verbreitete und bis zum heutigen Zeitpunkt eine große Herausforderung für Forschung und Medizin darstellt.

Da die meisten Antibiotika oral verabreicht werden, ist der Selektionsdruck auf Organismen, die den Nasen-Rachenraum kolonisieren, besonders hoch. Somit können auch Mikroorganismen der normalen Flora Resistenzen entwickeln. Durch die Eigenschaft der Streptokokken von Natur aus kompetent zu sein, können Antibiotikaresistenzen problemlos ausgetauscht werden. Die Ausbreitung der Penicillin-Resistenz erfolgt somit bei Streptokokken mittels horizontalen Gentransfers.

Die ersten Penicillin-resistenten Stämme traten im Labor auf und wurden als nicht bedeutend angesehen (Eriksen, 1945). Auch die ersten resistenten klinischen Pneumokokken-Isolaten, isoliert zwischen 1965 und 1971 in Boston, Australien und Papua-Neuguinea, erregten keine große Aufmerksamkeit und wurden als unbedenkliche Einzelfälle betrachtet (Hansman und Bullen, 1967; Hansman *et al.*, 1974; Kislak *et al.*, 1965). Bereits 1977 traten in Südafrika mehrere klinische Isolate auf, die nicht nur Penicillin-Resistenz aufwiesen, sondern multipel resistent waren und eine Erythromycin-, Chloramphenicol-, Rifampicin-, Streptomycin- und Tetracyclin-Resistenz zeigten (Jacobs *et al.*, 1978). Bald darauf traten mit zunehmender Häufigkeit weltweit multiresistente *S. pneumoniae*-Stämme auf, vor allem in Südafrika, Spanien und Ungarn (Appelbaum, 1987; Appelbaum, 2002; Fenoll *et al.*, 1991; Klugman, 1990; Klugman und Koornhof, 1988; Marton *et al.*, 1991).

Vor diesem Hintergrund ist es einerseits wichtig, die Entstehung und den Mechanismus der Penicillin-Resistenz auf molekularer Ebene zu verstehen und andererseits Targets für neue Klassen antimikrobieller Wirkstoffe zu identifizieren. Eine der geeignetsten Targets für antimikrobielle Wirkstoffe ist die Maschinerie der Zellwandbiosynthese. Peptidoglykan, als essentieller Bestandteil der bakteriellen Zellwand, ist die Komponente, die verantwortlich für Schutz, Stabilität und Form der Zelle ist. Deshalb sind gerade Enzyme, die an der Peptidoglykansynthese beteiligt sind, attraktive Targets für neue Wirkstoffe.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung von bislang unbekannten Mechanismen in *S. pneumoniae*, welche zu einer Resistenz gegenüber β-Laktamantibiotika führen.

# 1.1 Die Gattung Streptococcus

Die Gattung *Streptococcus* setzt sich aus einer Vielzahl heterogener Arten zusammen, die zu den häufigsten Krankheitserregern gehören. Das natürliche Habitat der Streptokokken ist der Körper von Mensch und Tier, wobei sie bevorzugt die Haut, die Schleimhäute der Mundhöhle, die oberen Atemwege und den Verdauungs- und Urogenitaltrakt besiedeln. Viele Streptokokken sind Teil der Normalflora und leben somit als Kommensale. Dazu gehören u.a. *S. mitis, S. oralis* und *S. mutans.* Ein Großteil der kommensalen Streptokokken ist jedoch als opportunistische Pathogene bekannt, welche im Fall eines geschwächten Immunsystems des Wirts die Entstehung von Krankheiten verursachen. Zu den wichtigsten humanpathogenen Streptokokken gehören *S. pneumoniae, S. pyogenes* und *S. agalactiae* (Hardie und Whiley, 1995; Patterson, 1991).

Ihren Namen verdanken diese Bakterien dem Arzt Theodor Billroth, der 1874 diese morphologisch auffälligen, kettenbildenden Mikroorganismen isolierte und mit einer Halskette verglich. Dabei steht "strepos" (gr.) für Kette und "coccus" (gr.) für Korn. Zehn Jahre später, 1884, wurde der Name *Streptococcus* als eigene Gattungsbezeichnung von Friedrich Julius Rosenbach eingeführt (Rosenbach, 1884).

## 1.1.1 Allgemeine Merkmale

Streptokokken gehören zur Familie der *Streptococcaceae* in der Ordnung *Lactobacillales*. Sie sind Gram-positive Milchsäurebakterien und aufgrund ihres niedrigen GC-Gehaltes werden sie dem Clostridium-Zweig zugeordnet (Schleifer und Ludwig, 1995). Streptokokken sind kugelförmige bis ovoide Zellen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm, die meist in Paaren oder unterschiedlich langen Ketten wachsen. Die Zellen sind unbeweglich, nichtsporulierend und Katalase-negativ. Die Mitglieder dieser Gattung sind fakultative bzw. aerotolerante Anaerobier und weisen einen homofermentativen Stoffwechsel mit Milchsäure als Hauptprodukt auf. Die Nährstoffanforderungen im Kulturmedium sind sehr komplex. Neben einer Kohlenstoffquelle benötigen Streptokokken auch Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine und Vitamine. Das Wachstum auf Festmedien erfordert den Zusatz einer nativen Eiweißquelle, z.B. in Form von Blut oder Serum (Hardie und Whiley, 1995). Das Temperaturoptimum liegt zwischen 35°C und 37°C.

## 1.1.2 Klassifizierung

Die Klassifizierung der Gattung *Streptococcus* erwies sich aufgrund ihrer großen Heterogenität als problematisch und ist nach wie vor nicht zufriedenstellend gelöst. Ein wichtiges Kriterium zur Einteilung der Streptokokken ist ihr Hämolyseverhalten auf bluthaltigen Festmedien, welches als erstes zur Differenzierung verwendet wurde (Brown, 1919). Man unterscheidet drei verschiedene Arten der Hämolyse: bei der  $\beta$ -Hämolyse sind die Kolonien von einem klaren Lysehof umgeben, der auf Schädigung der Erythrozyten und Abbau des Hämoglobins zurückzuführen ist (vollständige Hämolyse). Eine Vergrünung des Mediums um die Kolonien zeichnet die  $\alpha$ -Hämolyse aus, welche durch eine unvollständige Lyse der Erythrozyten hervorgerufen wird. Hierbei kommt es lediglich zu einer durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachten Umwandlung von Hämoglobin zu Methämoglobin oder Biliverdin-ähnlichen Verbindungen. Die  $\gamma$ -Hämolyse bezeichnet das Fehlen der hämolytischen Aktivität. Das Hämolyseverhalten zeigte sich allerdings als kein sicheres Unterscheidungsmerkmal, da Faktoren wie z.B. Art des verwendeten Blutes, Zusammensetzung des Mediums oder Sauerstoffbedingungen Einfluss auf die Hämolyse ausüben (Hardie und Whiley, 1995).

1933 teilte Rebecca Lancefield die β-hämolytischen Streptokokken aufgrund spezifischer Oberflächenantigene ein. Die Einteilung erfolgt dabei aufgrund der so genannten C-Substanz, ein Polysaccharid, das mit der Zellwand assoziiert ist. Die Einteilung erfolgt hierbei in so genannte Lancefield-Gruppen von A bis V (Lancefield, 1933). Zur Identifizierung verschiedener Pathogene erwiesen sich diese als nützlich, für die Einteilung der ganzen Gattung jedoch ungeeignet, da nicht alle Vertreter der Streptokokken das C-Antigen besitzen.

Heute werden vor allem molekularbiologische Methoden wie DNA-DNA-Hybridisierung, 16S rRNA-Sequenzanalysen oder MLSA (multilocus sequence analysis) zur Klassifizierung eingesetzt. Derzeit sind etwa 50 Streptokokken-Arten beschrieben (Kawamura *et al.*, 1995; Kilian *et al.*, 2008). Diese werden in sechs Gruppen eingeteilt: die Pyogenes-, Mitis-, Salivarius-, Anginosus-, Mutans- und Bovis-Gruppe. Für diese Arbeit waren die Stämme S. *pneumoniae* und *S. oralis* von Bedeutung, die der Mitis-Gruppe angehören.

## 1.1.3 S. pneumoniae

S. pneumoniae ist laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) einer der bedeutendsten Krankheitserreger mit rund 2 Millionen Todesfällen pro Jahr weltweit. S. pneumoniae, bekannt auch als Pneumokokkus, besiedelt als Kommensale die Schleimhäute des menschlichen Nasen- und Rachenraums. Bei kleinen Kindern oder Menschen mit geschwächtem Immunsystem tritt S. pneumoniae als opportunistischer Pathogen auf und Lungenentzündung (Pneumonie); Mittelohrentzündung (Otitis kann media), Nasennebenhöhlenentzündung (Sinusitis), Hirnhautentzündung (Meningitis), Herzmuskelinnenhautentzündung (Endocarditis) und Bakteriämie verursachen (Musher, 1992; Mitchell, 2003).

S. pneumoniae wächst in Paaren oder kurzen Ketten und gehört zu den  $\alpha$ -hämolytischen Streptokokken. S. pneumoiae lässt sich durch zwei physiologische Merkmale von anderen  $\alpha$ -hämolytischen Streptokokken unterscheiden. Zum einen anhand der Sensitivität gegenüber

Optochin (Bowers und Jeffries, 1955) und zum anderen anhand der Lyse der Zellen in Gegenwart von Gallenzellen (Neufeld *et al.*, 1928).

1981 isolierten Georg Miller Sternberg und Louis Pasteur unabhängig voneinander *S. pneumoniae* (Pasteur, 1981; Sternberg, 1981). Aufgrund seines Auftretens in Paaren wurde der Pneumokokkus zunächst als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet. Für die Pathogenität der Pneumokokken spielt eine Reihe von Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle. Der Hauptvirulenzfaktor dieses Organismus stellt die Polysaccharidkapsel dar, die eine Phagozytose durch Makrophagen des Immunsystems verhindert (Musher *et al.*, 2000). Aufgrund der Unterschiede in der Zusammensetzung der Polysaccharide lassen sich 91 verschiedene Pneumokokken-Serotypen unterscheiden (Bentley *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007). Weitere Virulenzfaktoren sind das Pneumolysin Ply (ein ß-Hämolysin), die IgA1-Protease, die Cholinbindeproteine CbpA (ein Zelloberflächenadhäsin) und PspA (Inhibitor des Komplementsystems), sowie die Neuraminidasen NanA und NanB und die Hyaluronidase HysA (Mitchell *et al.*, 1997).

## 1.1.4 S. oralis

Bridge und Sneath verwendeten zum ersten Mal den Namen *S. oralis* als Bezeichnung eines Clusters von oralen Streptokokken (Bridge und Sneath, 1983). *S. oralis* gehört zusammen mit *S. mitis* zu den oralen Streptokokken der Viridans-Gruppe (Kilpper-Bälz *et al.*, 1985; Kilian *et al.*, 1989). MLST-Analysen zeigten, dass *S. mitis* eng mit *S. pneumoniae* verwandt ist, während *S. oralis* ein entfernter Verwandter von *S. pneumoniae* ist (Chi, 2007). *S. oralis* ist gewöhnlich eine kommensale Art und bewohnt die oberen Atemwege des Menschen, kann jedoch zum opportunistischen Krankheitserreger werden und Endokarditis auslösen. *S. oralis* wächst in langen Ketten, zeigt ein  $\alpha$ -Hämolyseverhalten und hat einen GC-Gehalt von 38 bis 42 mol% (Hardie und Whiley, 1995; Whiley und Beighton, 1998).

## 1.1.5 Peptidoglykan und Peptidoglykanbiosynthese

Peptidoglykan oder Murein bezeichnet den wesentlichen Bestandteil der bakteriellen Zellwand, welcher der Zelle Form und mechanischen Schutz vor äußeren Einwirkungen verleiht. Die Bezeichnung "Murein", abgeleitet von murus, dem lateinischen Wort für Wand wurde zum ersten Mal von Weidel und Pelzer 1964 eingeführt.

Das Murein ist ein Heteropolymer aus den Zuckerderivaten N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure mit einem daran gebundenen Pentapeptid, die in alternierender Abfolge β-1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Aminosäure-Zusammensetzung des Pentapeptids ist bakterienspezifisch. In *S. pneumoniae* setzt sich die Pentapeptidkette aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin und zwei endständigen D-Alanin-Resten zusammen. Die glykosidische Bindung zwischen den beiden Zuckerderivaten reicht nicht

aus, um dem Peptidoglykan genügend Stabilität in allen Richtungen zu verleihen. Eine volle Stabilität wird erst durch Quervernetzungen der Pentapeptidstränge erreicht. Dabei werden benachbarte Muropeptidketten entweder direkt quervernetzt, wobei das D-Alanin in der vierten Position eine Peptidbindung mit dem L-Lysin des benachbarten Stranges ausbildet, oder über eine Interpeptidbrücke (L-Alanyl-L-Serin oder L-Alanyl-L-Alanin) verknüpft. Das D-Alanin an der fünften Position wird dabei abgespalten, wodurch Energie für diese Reaktion geliefert wird. Der Grad der Quervernetzung zwischen den Peptidsträngen ist unterschiedlich in verschiedenen Pneumokokken-Stämmen, wobei in resistenten Stämmen ein stark vernetztes Peptidoglykan vorkommt (Garcia-Bustos *et al.*, 1988; Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996).

Der generelle Aufbau des Peptidoglykans ist bei allen Eubakterien gleich. Enzyme, die an der Mureinsynthese beteiligt sind, stellen daher besonders geeignete Targets für antimikrobielle Wirkstoffe dar.

Die Peptidoglykanbiosynthese ist ein komplexer Prozess, an dem mehr als 20 Enzyme beteiligt sind. Die Synthese des Mureins vollzieht sich bei Pneumokokken in mehreren Teilschritten an drei unterschiedlichen Lokalisationen: im Cytoplasma, an der Cytoplasmamembran und an der Zellwand (Vollmer, 2007b). Abbildung 1.1. zeigt eine schematische Darstellung der Peptidoglykanbiosynthese in S. pneumoniae. Zunächst wird durch die MurA katalysierte Reaktion ein Enolpyruvatrest von Phosphoenolpyruvat an UDP-N-Acetylglukosamin transferiert. In der folgenden MurB katalysierten Reaktion wird das Enolpyruvatrest zu D-Lactat reduziert, wodurch UDP-N-Acetylmuraminsäure gebildet wird. In einer Reihe von Reaktionen, katalysiert durch die ATP-abhängigen Aminosäure-Ligasen MurC bis MurF, werden schrittweise die Aminosäuren des Pentapeptid-Stranges angehängt. Somit entsteht das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid, welches mit Hilfe von MraY und Freisetzung von UMP zu einem membrangebundenem Undecaprenylphosphat (Bactoprenol) transportiert wird, um Lipid I zu bilden. Durch die nachfolgende Glykosylierung von Lipid I mit UDP-N-Acetylglukosamin durch das Enzym MurG wird Lipid II gebildet. Im Falle von verzweigten Muropeptiden folgt dann die Addition einer Interpeptidbrücke an die ε-Aminogruppe des L-Lysins an Position drei des Pentapeptidstranges, wobei die Anheftung der ersten und zweiten Aminosäure entsprechend durch MurM und MurN katalysiert wird (Filipe und Tomasz, 2000; Weber et al., 2000). Anschließend wird das Disaccharid-Pentapeptid mit Hilfe des Undecaprenylphosphats zur Außenseite der Cytoplasmamembran transportiert. Vermutlich wird dieser Transport durch eine spezifische Translokase oder Flippase ermöglicht.

Dort katalysieren die Transglykosylasen die Synthese des Glykanstranges aus den Lipid II-Molekülen. Die Quervernetzung von zwei glykangebundenen Peptidketten erfolgt durch die Reaktion von Transpeptidasen. Schließlich wird durch die D,D-Carboxypeptidierung das

16

endständige D-Alanin der Pentapeptidkette abgespalten, womit der Vernetzungsgrad des Peptidoglykans reguliert wird. Die Transglykosylierungs- und Transpeptidierungsreaktionen sowie die D,D-Carboxypeptidierung werden von den Penicillin-bindenden Proteinen katalysiert (Barreteau *et al.*, 2008; Bouhss *et al.*, 2008).



Abb. 1.1: Peptidoglykanbiosynthese in S. pneumoniae

Das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid wird im Cytoplasma gebildet und auf den Lipidcarrier Bactoprenol übertragen. Das so gebildete Lipid I wird anschließend mit N-Acetylglukosamin polymerisiert, was zur Synthese von Lipid II führt. Nach Anhängen der Interpeptidbrücke wird der gebildete Komplex durch die Cytoplasmamembran transloziert. Dort wird durch Transglykosylierungsund Transpeptidierungsreaktionen, katalysiert von den Penicillin-bindenden Proteinen, der Disaccharid-Heptapeptid-Komplex in die bestehende Zellwand eingebaut.

MurNAc: N-Acetylmuraminsäure

GlcNAc: N-Acetylglykosamin

# 1.2 Penicillin-bindende Proteine (PBPs)

Penicillin-bindende Proteine sind membrangebundene Enzyme, die späte Schritte in der Zellwandbiosynthese katalysieren. Die von den PBPs katalysierten Reaktionen umfassen neben der Transglykosylierung von N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure und die Transpeptidierung von benachbarten Glykansträngen, auch die D,D-Carboxypeptidierung, wobei beim letzterem das endständige D-Alanin der Pentapeptidkette abgespalten wird (s. Abb. 1.2).



Abb. 1.2: Grundstruktur des Peptidoglykans in *S. pneumoniae* und die von PBPs katalysierten Reaktionen

Die Peptidoglykanstränge werden durch die Zuckerderivate N-Acetylglukosamin (G) und N-Acetylmuraminsäure (M) gebildet, die β-1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Quervernetzung der Peptidstränge erfolgt in *S. pneumoniae* entweder über eine Interpeptidbrücke aus L-Serin und L-Alanin oder durch eine direkte Verbindung. Die drei von den PBPs katalysierten Reaktionen sind durch rote Pfeile gekennzeichnet: Transglykosylierung, Transpeptidierung und D,D-Carboxy-peptidierung.

In allen bislang untersuchten Zellwand-bildenden Bakterien sind PBPs vorhanden, wobei jede Bakterienspezies über ein charakteristisches Set von PBPs verfügt. Bei den PBPs handelt es sich um Multidomänen-Proteine, die alle eine Penicillin-bindende Transpeptidase-Domäne enthalten. Alle PBPs besitzen drei konservierte Sequenzmotive, die das aktive Zentrum der Enzyme bilden: die SXXK-Box mit dem aktiven Serin, die SXN- und die KT(S)G-Box, wobei X für eine variable Aminosäure steht. Diese konservierten Homologieboxen sind auch bei bekannten 3D-Strukturen von β-Laktamasen vorzufinden und sind Teil der Penicillin-bindenden Domäne (Joris et al., 1988). Zudem werden aufgrund von struktureller Gemeinsamkeiten die PBPs zusammen mit den β-Laktamasen zu der Superfamilie der Acyl-Serin-Transferasen zusammengefasst (Ghuysen, 1991). PBPs werden nach ihrem Molekulargewicht in hochmolekulare (high molecular weight, hmw) und niedermolekulare (low molecular weight, lmw) PBPs unterteilt. Die hmw PBPs sind über einen kurzen N-terminalen hydrophoben Transmembranbereich in der Cytoplasmamembran verankert. Sie bestehen in der Regel aus einer kurzen Membrandomäne, gefolgt von einer N-terminalen Domäne und einer Penicillin-bindenden Domäne mit Transpeptidase-Aktivität. Bei einigen PBPs wird die Penicillin-bindende Domäne durch eine variable C-terminale Domäne flankiert (Macheboeuf et al., 2006; Sauvage et al., 2008). Abhängig von der Struktur und katalytischen Aktivität der N-terminalen Domäne werden die hmw PBPs zusätzlich in Klasse A und Klasse B unterteilt (Goffin und Ghuysen, 1998; Goffin und Ghuysen, 2002; Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008).

Klasse A PBPs sind bifunktionale Enzyme, die neben der Transpeptidase-Domäne am C-Terminus eine N-terminale Transglykosylase-Aktivität zeigen. Bei Klasse B PBPs handelt es sich um monofunktionale Enzyme mit Transpeptidase-Aktivität. Sie besitzen eine N-terminale Domäne unbekanter Funktion.

Lmw PBPs werden mit Signalpeptid synthetisiert und N-terminal prozessiert. In der Regel sind sie über eine C-terminale, amphiphile Helix mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Neben der Penicillin-bindenden Domäne besitzen sie eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion. Lmw PBPs sind D,D-Carboxypeptidasen, d.h. sie spalten die endständige D-Alanin-D-Alanyl-Bindung in den Mureinpentapeptiden. Somit wird der Grad der Quervernetzung reguliert, indem die Anzahl der für die Transpeptidierungsreaktion verfügbaren Pentapeptiden limitiert wird (Morlot *et al.*, 2004; Severin *et al.*, 1992).

*S. pneumoniae* besitzt sechs Penicillin-bindende Proteine (Hakenbeck *et al.*, 1986). Zur Klasse A der hmw PBPs in *S. pneumoniae* gehören PBP1a (79,7 kDa), PBP1b (89,6 kDa) und PBP2a (80,8 kDa). Klasse B hmw PBPs umfasst PBP2x (82,3 kDa) und PBP2b (82,3 kDa). Das PBP3 (45,2 kDa) mit einer D,D-Carboxypeptidase-Aktivität ist das einzige Imw PBP in *S. pneumoniae*. Abbildung 1.3 zeigt den schematischen Aufbau der sechs PBPs aus *S. pneumoniae*.





Links ist der schematische Aufbau der PBPs gezeigt. Die Domänenstruktur ist durch Balken angedeutet, wobei der mittlere blaue Balken die Penicillin-Binde-Domäne darstellt. Die drei konservierten Boxen (SXXK, SXN und KT(S)G) innerhalb dieser Domäne sind als schwarze Dreiecke gekennzeichnet. Der N-terminale hydrophobe Transmembranbereich der hmw PBPs und die C-terminale amphiphile Helix des Imw PBP3 sind als kurze schwarze Blöcke dargestellt. Klasse A hmw PBPs besitzen in der N-terminalen Domäne eine Transglykosylase-Aktivität.

Rechts ist schematisch die Auftrennung der sechs PBPs mittels SDS-PAGE dargestellt. hmw: high molecular weight; Imw: low molecular weight; S\*: aktives Serin Aufgrund ihrer Fähigkeit β-Laktame kovalent zu binden, können PBPs durch Markierung mit radioaktivem Penicillin oder Bocillin, einem fluoreszierenden Penicillin-V-Derivat, und Auftrennung mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht werden (Abb. 1.3) (Zhao *et al.*, 1999).

Die genauen Funktionen der einzelnen PBPs sind noch weitgehend unerforscht. Da keine Deletions- und Inaktivierungsmutanten von PBP2x und PBP2b hergestellt werden konnten, wird angenommen, dass diese beiden Proteine für *S. pneumoniae* essentiell sind (Kell *et al.*, 1993). Dagegen konnten Deletionsmutanten von PBP1a, PBP1b und PBP2a hergestellt werden und diese zeigten, dass PBP1a, PBP1b und PBP2a nicht essentiell sind. Allerdings schlugen Versuche fehl, PBP1a gleichzeitig mit PBP2a zu deletieren. Deshalb wird angenommen, dass entweder PBP1a oder PBP2a für das Wachstum erforderlich ist. Vermutlich können sich diese beide PBPs gegenseitig ersetzen, wenn eines der beiden PBPs deletiert ist (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). PBP3 kann inaktiviert werden, was darauf schließen lässt, dass es nicht essentiell ist. Allerdings konnten Defekte in der Zellteilungs-Septum, ein schwaches Wachstum, sowie eine Verdickung der Zellwand bei den PBP3-Mutanten beobachtet werden (Hakenbeck *et al.*, 1993; Schuster *et al.*, 1990).

Zum besseren Verständnis der Funktion der PBPs wurden zudem die Kristallstrukturen von fünf (PBP1a, PBP1b, PBP2b, PBP2x und PBP3) der sechs *S. pneumoniae* PBPs aufgeklärt (Contreras-Martel *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2005; Morlot *et al.*, 2005; Pares *et al.*, 1996).

Aufgrund von Lokalisierungsstudien der PBPs in der Zelle wurden Hypothesen über die Funktion der PBPs aufgestellt. PBP1a und 2x sind demnach an dem septalen Zellwachstum (Zellteilung) involviert, wohingegen PBP2a und 2b bei der peripheren Zellwandsynthese (Zellelongation) teilnehmen. PBP1b zeigte sowohl septale als auch äquatoriale Lokalisation in unterschiedlichen Zellen, und scheint somit an der septalen aber auch an der peripheren Zellwachstum beteiligt zu sein (Morlot *et al.*, 2003). PBP3 ist über die gesamte Zelloberfläche verteilt und scheint für die Koordination des Zellteilungsprozesses verantwortlich zu sein (Morlot *et al.*, 2004).

## 1.2.1 β-Laktamantibiotika und PBP-vermittelte β-Laktam-Resistenz

Der strukturell wichtigste Teil von Bakterien ist die Zellwand, die dem Organismus Stabilität und Schutz vor äußeren Einwirkungen verleiht. Sie stellt daher ein wichtiges Target für eine Reihe von Antibiotika dar. Hierzu zählt auch die Gruppe der  $\beta$ -Laktame, welche die PBPs inaktivieren und somit auf wachsende Zellen bakteriozid wirken. Im Laufe der Zeit haben Bakterien drei verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Wirkung der  $\beta$ -Laktame zu entgehen. Die Produktion von  $\beta$ -Laktamasen ist weit verbreitet und führt zur Hydrolyse des  $\beta$ -Laktamrings der  $\beta$ -Laktame. Ein anderer Mechanismus zur Resistenzentwicklung beruht auf Modifikationen in den Targetenzymen der  $\beta$ -Laktamantibiotika, den PBPs. Diese führen zu einer verminderten Affinität des Enzyms zu  $\beta$ -Laktamen. Beim dritten Mechanismus handelt es sich um eine Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran für  $\beta$ -Laktame. Bei *S. pneumoniae* spielt die Modifikation der PBPs eine zentrale Rolle für den Erwerb von  $\beta$ -Laktam-Resistenz.

## 1.2.1.1 β-Laktamantibiotika

Pneumokokken-Infektionen werden in der Regel mit  $\beta$ -Laktamantibiotika behandelt, da diese Bakterien eine natürlich hohe Suszeptibilität gegenüber diesen Antibiotika zeigen. Die Gruppe der  $\beta$ -Laktamantibiotika, deren bekanntesten Vertreter Penicillin G ist, ist von großer klinischer Bedeutung und umfasst neben den Penicillinen auch Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame und die  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie die Clavame.  $\beta$ -Laktame werden u.a. von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium, Cephalosporium* und *Aspergillus* sowie von einigen Bakterien produziert, können aber auch synthetisch bzw. halbsynthetisch hergestellt werden. Alle  $\beta$ -Laktamantibiotika besitzen einen viergliedrigen  $\beta$ -Laktamring, dem sie ihren Namen verdanken. Bei den Penicillinen ist an dem  $\beta$ -Laktamring ein fünfgliedriger Thiazolidinring gebunden, bei den Cephalosporinen, zu denen Cefotaxim gehört, ist der Thiazolidinring durch einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring ersetzt. Die Grundstruktur der Penicilline und Cephalosporine ist in Abbildung 1.4 gezeigt.



Abb. 1.4: Grundstruktur der Penicilline (A) und Cephalosporine (B)

Der  $\beta$ -Laktam-Ring ist eingerahmt. R= Reste, die für die jeweiligen Derivate spezifisch sind.

Die Wirkung der ß-Laktame erfolgt über die Inhibierung der Transpeptidierungs- und Carboxypeptidierungsreaktion der PBPs (Strominger et al., 1967). Dabei fungieren β-Strukturanaloga des D-Alanyl-D-Alanin-Restes der zu verknüpfenden Laktame als Pentapeptide inhibieren natürliches Substrat und somit Enzyme, deren das Mureinpentapeptid ist. Die PBPs binden kovalent Penicillin und andere β-Laktamantibiotika über den Serinrest im aktiven Zentrum und werden daher als Penicillin-bindende Proteine bezeichnet. Durch diese kovalente Bindung des Antibiotikums an dem Hydroxylrest des Serins entsteht ein stabiler Penicilloyl-Komplex, in dem das PBP enzymatisch inaktiv vorliegt und für die Peptidoglykansynthese nicht mehr zu Verfügung steht (Tipper und Strominger, 1965). Die Zellwand wird zwar weiterhin gebildet, aber nicht mehr quervernetzt, was zu erheblichem Verlust an Stabilität führt. Zusätzlich stimuliert der PBP-Penicilloyl-Komplex die Freisetzung von Autolysinen, welche die bestehende Zellwand verdauen (Tomasz, 1979). Die Zellwand wird soweit geschwächt und abgebaut, dass die Zellen aufgrund des osmotischen Druckunterschieds zwischen der äußeren Umgebung der Zelle und dem Zellinneren schließlich lysieren.

#### 1.2.1.2 β-Laktam-Resistenz in S. pneumoniae

Seit Anfang der achtziger Jahre treten weltweit gehäuft β-Laktam-resistente S. pneumoniae-Isolate auf (Klugman, 1990). Auch bei den kommensalen Streptokokken stellt die steigende Zahl an Antibiotika-resistenten Stämmen ein wachsendes Problem dar. Die Resistenz gegenüber β-Laktamantibiotika wird bei Streptokokken durch Modifikationen in den Targetenzymen, den PBPs hervorgerufen (Hakenbeck, 1995). Solche Modifikationen führen zu PBPs, die ihre physiologische Funktion in der Zelle weiter ausüben können, allerdings keine oder nur schwache Affinität zu β-Laktamen zeigen. Diese durch Mutationen veränderte niederaffine PBPs werden bei weitaus höheren Antibiotikakonzentrationen gehemmt als unveränderte PBPs. Für die β-Laktam-Resistenz ausschlaggebende Mutationen wurden bisher ausschließlich in der Transpeptidase-Domäne beobachtet. Dabei unterscheidet sich die Art der Mutationen in klinischen Isolaten und Labormutanten von S. pneumoniae (Denapaite et al., 2007). Während bei β-Laktam-resistenten Labormutanten vereinzelt Punktmutationen in der Transpeptidase-Domäne nachgewiesen werden können (Hakenbeck et al., 1994; Laible und Hakenbeck, 1991; Krauß et al., 1996), finden sich in den Genen der PBPs aus resistenten klinischen S. pneumoniae Isolaten Mosaikstrukturen. Dabei sind in den Genen Sequenzbereiche durch homologe Sequenzen ersetzt, die sich in bis zu 25 % von den Sequenzen sensitiver Stämme unterscheiden (Dowson et al., 1989a; Dowson et al., 1989b; Laible et al., 1991; Martin et al., 1992).

Es wurde gezeigt, dass in S. pneumoniae alle sechs PBPs zu niedrig affinen Varianten modifiziert werden können. Die essentiellen PBP2x und PBP2b sind primäre Targets vieler der β-Laktame und werden im Zuge der Resistenzentwicklung als erste Proteine modifiziert (Grebe und Hakenbeck, 1996). Niederaffine Varianten der beiden Proteine vermitteln nur Resistenzzunahme, eine aerinae sind aber Voraussetzung für die Entstehung und Hakenbeck 1996). PBP1a ist sekundäre hochresistenter Stämme (Grebe Resistenzdeterminante, die zur Entstehung hoher Resistenzniveaus führen kann, allerdings nur wenn Veränderungen in PBP2x und PBP2b bereits vorliegen (Barcus et al., 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß et al., 1996; Muñoz et al., 1992). Niederaffine Varianten von PBP2a wurden sowohl in klinischen Isolaten als auch in Labormutanten in Verbindung mit niederaffinem PBP2x beschrieben, aber die Rolle von PBP2a in der β-Laktam-Resistenz ist

22

noch weitgehend unklar (du Plesis *et al.*, 2000; Hakenbeck *et al.*, 1998; Reichmann *et al.*, 1996; Sanbongi *et al.*, 2004). Die Rolle von PBP1b bei der Ausbildung der Resistenz ist bislang ungeklärt. Eine niederaffine Variante dieses Proteins wurde bisher nur in *S. pneumoniae*-Stämmen beobachtet, die mit chromosomaler DNA eines hochresistenten *S. mitis*-Isolats transformiert wurden (Hakenbeck *et al.*, 1998). Eine Modifikation des Imw-PBP3 konnte bislang nur in Labormutanten beschrieben werden (Krauß und Hakenbeck, 1997).

# 1.3 Entstehung und Ausbreitung der PBP-vermittelten β-Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae*

Mosaikgene in resistenten klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten sind das Resultat von Gentransfer-Ereignissen zwischen verwandten Arten, gefolgt von homologer Rekombination. Gentransfer in *S. pneumoniae* wurde zuerst von Griffith 1928 beschrieben (Griffith, 1928). Als Vorreiter der Molekulargenetik entdeckte Griffith, dass abgetötete, bekapselte Stämme lebenden, unbekapselten Stämmen in Mäusen die Fähigkeit zur Bildung einer Kapsel übertragen können. Diese Eigenschaft nannte er Transformation und bewies, dass Erbinformationen weitergegeben werden können.

Die Aufnahme exogener DNA wird als bakterielle Transformation bezeichnet. Transformierbare Stämme können DNA in einem definierten Zeitabschnitt ihrer Wachstumsphase aufnehmen, in dem sie als kompetent bezeichnet werden. Die Kompetenzphase kann bei verschiedenen Spezies in der Dauer variieren und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Wachstumsphase auftreten.

Die Fähigkeit zur genetischen Transformation ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung und Ausbreitung der β-Laktam-Resistenz in Pneumokokken.

#### 1.3.1 Natürliche Kompetenz in S. pneumoniae

Die Regulation der Kompetenz in *S. pneumoniae* erfolgt über einen Quorum-Sensing-Mechanismus, an dem die fünf Gene *comAB* und *comCDE* beteiligt sind. Die Kompetenz wird durch das Peptid-Phäromon CSP (competence stimulating peptide) induziert, welches von *comC* kodiert wird. Dabei wird zunächst das 41 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid von CSP gebildet, welches nach Prozessierung und Sekretion über den ABC-Transporter ComAB als funktionsfähiges 17 Aminosäuren langes Polypeptid existiert und sich im Medium ansammelt (Håvarstein *et al.*, 1995a; Håvarstein *et al.*, 1995b). Wird bei einer bestimmten Zelldichte eine kritische Konzentration von CSP in Medium erreicht, kommt es durch einen Signaltransduktionsweg zur Induktion der Kompetenz. Das an der Kompetenz beteiligte Zwei-Komponenten-System ComDE wird von den Genen *comD* und *comE* kodiert, welche in einem Operon mit *comC* liegen. Das sekretierte CSP bindet an der membrangebundenen Histidinkinase ComD, die dadurch autophosphoryliert wird und die Phosphatgruppe auf den Response-Regulator ComE überträgt. Der phosphorylierte Response-Regulator aktiviert die Transkription der "frühen" Kompetenzgene *comAB* und *comCDE* durch Bindung an eine Repeat-Sequenz in der jeweiligen Promotorregion (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). Dieses autoinduzierte System verstärkt somit die Antwort auf das durch CSP gesetzte Signal. Dadurch wird mehr CSP produziert, was dazu führt, dass die Menge an phosphoryliertem ComE in der Zelle erhöht bleibt.

Zu den "frühen" Kompetenzgenen gehören zudem *comX1* und *comX2*. Diese kodieren für den alternativen Sigma-Faktor ComX. Dieser wiederum bewirkt die Induktion der "späten" Kompetenzgene, die für die Aufnahme von DNA und Rekombination verantwortlich sind (Pestova *et al.*, 1996). Zur Veranschaulichung ist das Modell für die Regulation der Kompetenz in Abbildung 1.5 dargestellt.



Abb. 1.5: Regulation der genetischen Kompetenz in S. pneumoniae

Dargestellt ist schematisch der Signaltransduktionsweg zur Regulation der genetischen Kompetenz. Prä-CSP: Genprodukt von *comC* (Vorläuferpeptid des CSP); CSP: Competence stimulating peptide (prozessierte Form des *comC*-Genprodukts); ComAB: ABC-Exporter; ComD: Histidinkinase; ComE: Response-Regulator; ComX: Alternativer Sigma-Faktor.

# 1.3.2 Evolution und Ausbreitung der β-Laktam-Resistenz durch horizontalem Gentransfer

In resistenten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* werden niederaffine PBPs gefunden, welche von *pbp*-Genen mit Mosaikstrukturen kodiert werden. In diesen Genen sind Sequenzabschnitte durch homologe Sequenzen ersetzt worden, die sich in bis zu 25 % auf

Nukleotidebene und in ca. 10 % auf Aminosäure-Ebene von den korrespondierenden Sequenzen sensitiver Stämme unterscheiden. Niederaffine Varianten sind für vier der fünf hmw PBPs in S. pneumoniae beschrieben (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 verwandten kommensalen Streptokokken sind. So wurden z.B. PBP-Mosaikblöcke in resistenten S. pneumoniae-Stämmen gefunden mit homologen Nukleotidsequenzen zu den entsprechenden Sequenzen in sensitiven und resistenten S. sanguis, S. mitis und S. oralis (Chalkley et al., 1991; Dowson et al., 1990; Potgieter und Chalkley, 1995; Reichmann et al., 1997; Sibold et al., 1994). Da identische Mosaik-PBPs in verschiedenen S. pneumoniae-Klonen vorkommen wird auch einen Gentransfer innerhalb der Art angenommen (Coffey et al., 1991; Muñoz et al., 1991). PBP-Gen-Sequenzvergleiche von resistenten und sensitiven Streptokokken-Spezies zeigten, dass auch in sensitiven kommensalen Streptokokken, wie S. mitis und S. oralis, PBPs vorkommen, die sehr ähnlich zu den Mosaikgenen in resistenten Stämmen sind (Dowson et al., 1993; Hakenbeck et al., 1999; Sibold et al., 1994). Daher wird vermutet, dass sich die β-Laktam-Resistenz durch Ansammlung spontaner Punktmutationen in den pbp-Genen kommensaler Streptokokken entwickelte, bevor resistenzrelevante Sequenzbereiche mittels horizontalen Gentransfers in den Pneumokokken übertragen wurden. In S. pneumoniae können sekundäre Mutationen zur Veränderung des Resistenzniveaus führen. Abb. 1.6 zeigt das Modell zur Entwicklung der β-Laktam-Resistenz in S. pneumoniae.

Vermutet wird, dass ein globaler Genpool von Resistenzdeterminanten existiert, der verschiedenen kommensalen und pathogenen Streptokokken zur Verfügung steht (Chalkley *et al.*, 1991; Coffey *et al.*, 1993; Dowson *et al.*, 1990; Dowson *et al.*, 1993; Sibold *et al.*, 1992).



Abb. 1.6: Modell zur Entstehung resistenzrelevanter Mosaikgene in S. pneumoniae

Nukleotid-Sequenzen von *pbp*-Genen sensitiver Pneumokokken sind als weiße Balken dargestellt. Blaue Balken repräsentieren homologe *pbp*-Gene aus kommensalen Streptokokken. Durch die Ansammlung von Punktmutationen (dargestellt als Striche) entwickelt sich ein *pbp*-Gen in einer kommensalen *Streptococcus*-Spezies zu einer Resistenzdeterminante. Mittels horizontalem Gentransfer und Rekombination kann anschließend diese Resistenzdeterminante in sensitive Pneumokokken übertragen werden. Dort kann es zu sekundären Mutationen in diesem Mosaikgen kommen, die womöglich eine noch höhere Resistenz bewirken.

# 1.4 Nicht-PBP-vermittelte β-Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae*

Zusätzlich zu der PBP-vermittelten  $\beta$ -Laktam-Resistenz wurden in *S. pneumoniae*-Stämmen PBP-unabhängige Mechanismen der  $\beta$ -Laktam-Resistenz beschrieben. So konnte z.B. in Piperacillin-resistenten Labormutanten von *S. pneumoniae* Mutationen in dem für eine Glykosyltransferase kodierenden Gen *cpoA* identifiziert werden, welche zur Resistenzerhöhung gegen Piperacillin führten (Grebe *et al.*, 1997). Zudem wurde in diesen Labormutanten eine Abnahme der natürlichen Kompetenz, sowie eine Reduktion der Menge von PBP1a beobachtet. Dies ist auch in Übereinstimmung mit dem Namen von *cpoA* (regulator of <u>competence and PonA</u>), wobei *ponA* die ältere Bezeichnung von *pbp1a* ist.

Die Histidinkinase CiaH des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH ist die erste identifizierte Resistenzdeterminante, welche nicht durch eine Veränderung in einem *pbp*-Gen zu einer höheren Resistenz gegen Cefotaxim führt (Guenzi *et al.*, 1994). Modifikationen in *ciaH* führten auch in diesen Labormutanten zu einer Reduktion der genetischen Kompetenz, aber auch zu einer Lyse-Resistenz unter verschiedenen Bedingungen (Mascher *et al.*, 2006).

In klinischen Isolaten ist *murM* als einziges Nicht-PBP-Gen als Resistenzdeterminante, involviert in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz beschrieben (Filipe und Tomasz, 2000; Smith und Klugmann, 2001). MurM befindet sich in einem Operon mit *murN* und beide Genprodukte

stellen einen Teil der Zellwandbiosynthese dar, wo sie die Quervernetzung der Peptidketten katalysieren. Die Inaktivierung des *murMN*-Operons in hochresistenten *S. pneumoniae*-Stämmen führt zur Reduktion der verzweigten Muropeptide und zu einem Verlust der Penicillin-Resistenz (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Mosaik-MurM-Gene wurden in einigen klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* beschrieben und deren Beitrag zur Entwicklung der Penicillin-Resistenz untersucht (Filipe *et al.*, 2000; Filipe und Tomasz, 2000; Smith und Klugmann, 2001; Weber *et al.*, 2000).

# 1.5 MurE: Eine Aminosäure-Ligase in der Peptidoglykanbiosynthese

MurE ist ein Enzym, involviert in der Peptidoglykanbiosynthese und gehört zur Familie der Mur-Ligasen. Es ist die dritte Ligase in dem Murein-Biosyntheseweg und katalysiert in Grampositiven Bakterien die Addition von L-Lysin (L-Lys) und in Gram-negativen Bakterien von meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP) an die wachsende Peptidkette (entsprechend UDP-Nacetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat: L-Lysin-Ligase oder UDP-N-acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat: meso-Diaminopimelat-Ligase). MurE wurde beschrieben als sehr spezifisch in der Wahl zwischen diesen beiden Aminosäuren und erlaubt die Addition entweder von L-Lys oder m-DAP in die Peptidkette (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1994; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1999). In *S. pneumoniae* katalysiert das Enzym folgende Reaktion:

 $UDP-MurNAc-L-Ala-D-Gln + L-Lys + ATP \rightarrow UDP-MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys + ADP + P_i.$ 

Durch ihre ε-Aminogruppe sind L-Lysin oder meso-Diaminopimelat in der Quervernetzung zwischen den Peptidketten involviert und spielen somit eine Schlüsselrolle in der Stabilität der Zellwand (Štrancar *et al.*, 2007). Alle Mur-Ligasen katalysieren die ATP-abhängige Bildung einer Peptidbindung und arbeiten mit dem gleichen katalytischen Mechanismus: erstens, die Phosphorylierung der Carboxylgruppe am C-terminalen Ende des Substrats unter Bildung eines Acylphosphat-Zwischenproduktes und zweitens, der nukleophile Angriff des letzteren durch die Aminogruppe der entsprechende Aminosäure (L-Lys im Falle von MurE) unter Bildung der Peptidbindung und Freisetzung von anorganischem Phosphat (Bouhss *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 1996).

Alle Mur-Proteinen sind essentiell und hoch konserviert in verschiedenen Spezies (Zoeibly *et al.*, 2003). Zudem zeigen die Mur-Ligasen mehrere Sequenz-Homologien, was vermuten lässt, dass sie aus einem gemeinsamen Gen stammen (Eveland *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1990).

Die 3D-Struktur von MurE aus *E. coli* wurde 2001 von Gordon *et al.* beschrieben. Das Protein besteht, wie die anderen Mur-Ligasen, aus drei Domänen: einer N-terminalen Domäne von AS 1-88; einer zentralen, ATP-binde-Domäne (AS 90-338) und der

C-terminalen Domäne (AS 340-497) (Gordon *et al.*, 2001). Das Produkt, UDP-NAc-Tripeptid, bindet in der Spalte zwischen den drei Domänen. Sequenzvergleiche der verschiedenen Mur-Ligasen in unterschiedlichen Bakterienspezies haben ergeben, dass alle das ATP-Binde-Motiv GXXGKT gemeinsam haben. Zudem wurden sieben weitere konservierte Aminosäuren identifiziert, die als wichtig für die Bindung des Substrats oder als essentiell für den katalytischen Prozess beschrieben wurden (Bouhss *et al.*, 1997, Bouhss *et al.*, 1999).

Eine für diese Arbeit relevante Aussage zu MurE lieferte die 2004 von Gardete *et al.* publizierte Studie, welche die Rolle von *murE* aus *S. aureus* in der β-Laktam-Resistenz beschreibt. Hierbei führte eine Transposon-Insertion in *murE* in einem Methicillin-resistenten Stamm zu einem Abfall der Resistenz, begleitet von Akkumulation von UDP-MurNAc-Dipeptid in den Mutanten. Weiterhin führte ein Anstieg der Expression von *murE* zu einer Erhöhung der Transkription von *pbpB* und *mecA*, kodierend für PBP2 und PBP2a. Die Expression dieser zwei Proteine, involviert in der Methicillin-Resistenz in Staphylokokken scheint somit unter der Kontrolle von *murE* zu stehen (Gardete *et al.*, 2004).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in dem Inter-Spezies Gentransfer zwischen S. pneumoniae und dem hochresistenten ungarischen Isolat S. oralis Uo5. Grundlage für diese Arbeit war eine von Hakenbeck et al. publizierte Studie über den Inter-Spezies Gentransfer zwischen S. pneumoniae und dem hochresistenten S. mitis B6. Dabei konnten durch sukzessive Transformation mit chromosomaler DNA aus S. mitis B6 und dreifacher Selektion auf immer höheren Konzentrationen von Cefotaxim nacheinander PBP2x, PBP2a, PBP1a und PBP1b ausgetauscht werden. Die anschließende Selektion auf Oxacillin oder Benzylpenicillin führte zu dem Transfer von PBP2b. Durch die Übertragung der fühf niederaffinen PBPs aus S. mitis B6 konnte die Resistenz für Cefotaxim des Donorstammes erreicht werden (Hakenbeck et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob der resistente S. oralis Uo5 ebenfalls als Donor für die Entstehung der β-Laktam-Resistenz in Pneumokokken fungieren kann. Hierbei war von Interesse welche der Mosaik-PBPs von S. oralis einen Beitrag zur Entwicklung der β-Laktam-Resistenz in S. pneumoniae leisten. Mittels sukzessiver DNA-Transformation mit einer immer höheren Selektion auf β-Laktamantibiotika sollte untersucht werden, ob der Resistenzphänotyp von S. oralis auf S. pneumoniae übertragbar ist.

Die Identifizierung und Charakterisierung bisher unbekannter Nicht-PBP-Resistenzdeterminanten stellte das Hauptziel dieser Arbeit dar. Hierbei sollten *S. pneumoniae*-Transformanten, welche aus sukzessiver Transformation mit *S. oralis* Uo5 DNA resultierten, mittels Microarray-Analyse untersucht und Gene, welche neben den PBPs verändert wurden, identifiziert werden. Neue potentielle Resistenzdeterminanten sollten somit entdeckt werden. Im Falle einer erfolgreichen Identifizierung eines unbekannten resistenzvermittelnden Gens war es ein weiteres Anliegen dieser Arbeit, den Einfluss dieser Determinante alleine und in Verbindung mit niederaffinen PBPs auf die β-Laktam-Resistenz zu überprüfen.

# 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 aufgelistet. Dabei zeigt Tab. 2.1 die *Streptococcus*-Stämme, die als Ausgangsstämme für die konstruierten Derivate in Tab. 2.2 dienten und Tab. 2.3 die verwendeten *E. coli*-Stämme. Generell erfolgte die Benennung der in dieser Arbeit hergestellten *S. pneumoniae*-Derivate nach den Selektionsantibiotika in der Reihenfolge, wie sie verwendet wurden. Dabei steht P für Piperacillin, C für Cefotaxim und O für Oxacillin. Transformationen mit amplifizierten Fragmenten wurden durch Klammern angezeigt, wobei das in Klammern stehende Gen dem Amplifikat entspricht.

Bezeichnung	Genotyp	Relevanter Phänotyp	Referenz
S. pneumoniae R6		R36A-Derivat,	Avery <i>et al.</i> , 1944;
		kapselfrei, hoch-	Ottolenghi und
		kompetent, β-Laktam <sup>S</sup>	Hotchkiss, 1962
S. oralis Uo5		ungarisches Isolat aus nasalem Abstrich, β- Laktam <sup>R</sup>	Reichman <i>et al</i> ., 1997 (hier Hu5 genannt)
S. pneumoniae AmiA9	rpsL(K56T)	Str <sup>R</sup>	Sicard, 1964; Salles, 1992
S. pneumoniae R6 ciaR::aad9	ciaR::aad9	Spc <sup>R</sup>	Zähner, 1999

#### Tab. 2.1: Verwendete Ausgangs-Streptokokken-Stämme

#### Tab. 2.2: Konstruierte Derivate von S. pneumoniae

Stamm	Genotyp	Phänotyp
P2	murE*	β-Laktame <sup>R</sup>
O4	pbp2x	β-Laktame <sup>R</sup>
P20	pbp2x; murE	β-Laktame <sup>R</sup>
PC3	pbp2x; murE; pbp1a	β-Laktame <sup>R</sup>
PCP7	pbp2x; murE; pbp1a; pbp2b	β-Laktame <sup>R</sup>
PCPC6	pbp2x; murE; pbp1a; pbp2b;	β-Laktame <sup>R</sup>
PCPCC5	pbp2x; murE; pbp1a; pbp2b;	β-Laktame <sup>R</sup>
PCPCCO2	pbp2x; murE; pbp1a; pbp2b;	β-Laktame <sup>R</sup>
O(2x)8	pbp2x	β-Laktame <sup>R</sup>
P(murE)	murE	β-Laktame <sup>R</sup>
P(murE*)	murE*	β-Laktame <sup>R</sup>

Stamm	Genotyp	Phänotyp
P(murE**)	murE**	β-Laktame <sup>R</sup>
PC(murE**/2x)	murE**; pbp2x	β-Laktame <sup>R</sup>
PCP(murE**/2x/2b)	murE**; pbp2x; pbp2b	β-Laktame <sup>R</sup>
PP(murE/2b)	murE; pbp2b	β-Laktame <sup>R</sup>
P(2b)	pbp2b	β-Laktame <sup>R</sup>
OP(2x/2b)	pbp2x; pbp2b	β-Laktame <sup>R</sup>
OP(2x/murE <sup>MS</sup> )	pbp2x; murE <sup>MS</sup>	β-Laktame <sup>R</sup>
O(2x)UR∆murE	<i>pbp2x</i> ;ektopische <i>murE</i> -Kopie mit Uo5-Promotor; <i>murE::aad9</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup>
O(2x)RR∆murE	<i>pbp2x</i> ; ektopische <i>murE-</i> Kopie; <i>murE::aad9</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup>
O(2x)UU∆murE	<i>pbp2x</i> ; ektopische Uo5 <i>murE</i> -Kopie mit Uo5- Promotor; <i>murE::aad</i> 9	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup>
O(2x)RU∆murE	<i>pbp2x</i> ; ektopische Uo5 <i>murE</i> -Kopie mit R6- Promotor; <i>murE::aad</i> 9	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup>
$R6_P_{murER6}$	bgaA::tetMPmurER6-lacZ	Tet <sup>R</sup>
$R6_P_{murEUo5}$	bgaA::tetMP	Tet <sup>R</sup>
O(2x)8PP2x	pbp2x bgaA::tetMPpbp2x-lacZ	$\beta$ -Laktame <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>
RU3PP2x	<i>pbp2x</i> ; ektopische Uo5 <i>murE-</i> Kopie mit R6- Promotor; <i>murE::aad9, bgaA::tetM</i> P <i>pbp2x-lacZ</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>
UU1PP2x	<i>pbp2x</i> ; ektopische Uo5 <i>murE-</i> Kopie mit Uo5- Promotor; <i>murE::aad9, bgaA::tetM</i> P <i>pbp2x-lacZ</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>
UR2PP2x	<i>pbp2x</i> ;ektopische <i>murE</i> -Kopie mit Uo5-Promotor; <i>murE::aad9, bgaA::tetM</i> P <i>pbp2x-lacZ</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>
RR2PP2x	<i>pbp2x</i> ; ektopische <i>murE-</i> Kopie; <i>murE::aad9,</i> <i>bgaA::tetM</i> P <i>pbp2x-lacZ</i>	β-Laktame <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Tmp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>

## Tab. 2.3: Verwendete E. coli-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DH5a	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZ, ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
JM109	recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ(lac-proAB), F´[traD36, proAB+, laclq, lacZΔM15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

# 2.2 Plasmide

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide zusammengestellt.

#### Tab. 2.4: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Merkmale	Selektion	Referenz
pSW1	Derivat von pPB3 in welches eine MCS eingebracht wurde	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 μg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Schnorpfeil, 2010
pSW1+PR6 <i>murE</i> Uo5	pSW1-Derivat; besitzt PR6 <i>murE</i> ; <i>murE</i> Uo5	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 μg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pSW1+PUo5 <i>murE</i> R6	pSW1-Derivat; besitzt PUo5 <i>murE</i> ; <i>murE</i> R6	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 μg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pSW1+PR6 <i>murE</i> R6	pSW1-Derivat; besitzt PR6 <i>murE</i> ; <i>murE</i> R6	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 μg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pSW1+PUo5 <i>murE</i> Uo5	pSW1-Derivat; besitzt PUo5 <i>murE</i> ; <i>murE</i> Uo5	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 μg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pPP2	Replikon: ColE1, Marker: <i>bla, tetM</i> amp <sup>R</sup> , tet <sup>R</sup>	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli,</i> Tetracyclin 3 μg/ml in <i>S.</i> pneumoniae	Halfmann <i>et al.,</i> 2007
pPP2 <i>pbp2x</i>	pPP2-Derivat, enthält R6 P <i>pbp2x-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli,</i> Tetracyclin 3 μg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Peters, 2009
pPP2 R6 <i>murE</i>	pPP2-Derivat, enthält R6 P <i>murE-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli,</i> Tetracyclin 3 μg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	diese Arbeit
pPP2 Uo5 <i>murE</i>	pPP2-Derivat, enthält Uo5 P <i>murE-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μg/ml in <i>E. coli,</i> Tetracyclin 3 μg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	diese Arbeit

# 2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von den Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Die Oligonukleotide wurden so in H<sub>2</sub>O aufgenommen, dass die erhaltene Stammlösung eine Konzentration von 100 pmol/µl hatte. Für die Gebrauchslösungen wurden die Stammlösungen 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Lagerung der Stamm- und Gebrauchslösungen erfolgte bei -20°C.

Tab. 2.5: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp1a* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 105	32→	GGAATGTCTTTTGAAAAGATGATCAATGCTAC
PM 106	29←	GTAGAGAAACCTGAGTTTAAACTTAGCTC
PM 185	35→	TGAGCCAAGCGTTCGTGTGGCGCTGCTTCAAATTG
PM 186	30→	ACTACTAATCCTAAGAACAAAACACTCAAG
PM 187	33←	TCACCGAGGAATTGACACGATCCGTATCCTAGG

# Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp2x* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 109	36→	TGACCAAGCAATTGTTCAAAGAGGCTTCAACAGTTG
PM 110	26←	TCATAAAAGAGATAGAAGATAACTCC
PM 115	27→	TTTATATGCAAACCAAGCTCTTGCAAG
PM 116	28→	TAGCTCAGCTCCATGAAAATGAAGATGG
PM 117	30←	TTCATAGGTAATAATACCGTCTGTCCCTGC
PM 118	27→	TTCGTGCCTTTACAGCTATTGCTAATG
PM 119	29←	GAAACAGGATTTCCTACTATTTCTTTTTG
PM 120	32←	TAAAGTTAGTAAAAATGTCACAATTCCAGCAC

Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation	und Sequenzierung	von pbp2b aus	S. pneumoniae
R6 und <i>S. oralis</i> Uo5			

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 113	30→	GTAAAACCACACTTTTTGGAAAAGCGGGTC
PM 114	29←	ACCTCTGAAACCTCGCTATCCATAAGACG
PM 125	26→	GCAAAAAATAGCGAGCGATTTCTTGC
PM 126	31←	CAGCATTGAGCTGGCTAAAGAGATAGATTTC
PM 127	29→	CCAAGCGATAAACGCCTGGATTCAGATGG
PM 128	28←	CCTGACAAGACCCCATTTTCCCAACCTG
PM 129	23→	GTCACCAATGTCTTTGTTCCAGG
PM 130	25←	CTTAGCTATAGGTGTTGGGTAAAGC
Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
--------	--------------------------------	----------------------------------
PM 170	28→	CTGCAAAACTGCAAAGACAAATAAACCC
PM 171	30←	GGGAGCAGGAGATTAGTGATTTTTGGAGGG
PM 172	30→	CTTCCATTATAAACTTTTCCTTGTTACTTG
PM 173	28←	CTGCTCGGCTATTTTCATCAAGAGACG
PM 174	32→	GTCTTTCTTAACATCACTCCTGACCATATCGG
PM 175	26←	GGTGCTGTAGAAGGTGCCGTTGAAGG
PM 279	30←	GCTGTAGTTGTAGTGGTAATGACCTTGGTC

# Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *murE* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5

#### Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von ciaH aus S. pneumoniae R6

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
ciaH_for	30→	TCGGTTGTCGAAGTCTATGTTTCAAAAGTC
ciaH_rev	25←	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
ciaH-seq_for	29→	AATTGATTGTGGTCGTGATGGCTAGTTTC

# Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *cpoA* aus *S. pneumoniae* R6

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
cpoAseq1	20→	GCGCACACTTGAAGATGTGG
cpoAseq2	20→	AGCATGTGAGAGACTGTTGG
cpoAseq5	20←	TCCTGCTTGATTTCCGGACG
cpoAseq6	20←	TACTTTCTCCCTAAAGCGGC

#### Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Herstellung einer ektopischen Kopie von murE

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 277	93→	CTA <u>GCTAGC</u> ATCTTCCATTATAAACTTTTCCTTGTTACTT
		GTAAATTTACGACTTTCGGTTTACAATAGAAAGTATGATT
		AAGATTGAAACCG
PM 278	93→	CTA <u>GCTAGCATCTTCCATTATAAACTTTTCCTTGTTACTT</u>
		GTAAAATTCGGGCTTGAAGTTTATAATAGAAAGTATGATT
		AAGATTGAAACCG
PM 270	32←	GCC <u>GGATCC</u> GCTGTAGAAGGTGCCGTTGAAGG

Angefügte *BamHI* und *NheI* Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; grün eingezeichnet sind die Promotorregionen von *murE* aus R6 (PM 277) und Uo5 (PM 278).

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 170	28→	CTGCAAAACTGCAAAGACAAATAAACCC
PM 171	30←	GGGAGCAGGAGATTAGTGATTTTTGGAGGG
PM 271	27←	CTAATAC <u>GGATCC</u> AATCTTAATCATAC
PM 272	30←	CATCCAGG <u>GCTAGC</u> AAGAATCCTACCCAGG
PM 273	28→	CTTATTGGTTGA <u>GGATCC</u> CCTAGCATCG
PM 274	38←	ATTTGACAGA <u>GCTAGC</u> CCAATTAGAATGAATATTTCCC

Tab.	2.12:	Oligonukleotide <sup>•</sup>	für die	Inaktivierung	von	murF
Tub.	£ £.	ongonaniconac		manany		mai

Angefügte BamHI und Nhel Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

#### Tab. 2.13: Oligonukleotide zum überprüfen der MCS in pSW1

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
pPB4_f	30→	CCGATTCCGGGTTCATATGAAAATTCCTCC
pPB5_r	30←	CTACGCTGATGAACCTGAATCAGTCCCTCA

## Tab. 2.14: Oligonukleotide für die Klonierung der Promotorregionen von *murE* aus *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 in pPP2

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
PM 275	34→	CGC <u>GCATGC</u> TCTTCCATTATAAACTTTTCCTTG
PM 276	35←	CGC <u>GGATCC</u> TATCTAATACGGTTTCAATCTTAATC

Angefügte Sphl und BamHl Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

## Tab. 2.15: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierungen in pPP2, sowie zur Bestätigung der korrekten Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6

Name	Länge [bp] und Orientierung	Sequenz (5´→3´)
EII_fwd_Kontr	26→	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_Kontr	25←	ATCTTTCACGGGCATATAACGATGC
lacZ_fwd_Kontr	26→	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
bgaA_rev_Kontr	26←	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC
MCS_fwd_Kontr	22→	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274_lac	20←	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG

## 2.4 Nährmedien

#### 2.4.1 Nährmedien zur Anzucht von S. pneumoniae

#### 2.4.1.1 C-Medium

Zur Anzucht der Streptokokken-Stämme wurde ein komplexes Medium, das Komplettmedium CpH8 (Lacks und Hotchkiss, 1960) verwendet. Die Einzelkomponenten des

Mediums wurden getrennt hergestellt und unmittelbar vor Gebrauch des Mediums steril zusammenpipettiert. Tabelle 2.16 zeigt die Zusammensetzung des CpH8-Mediums, Tabelle 2.17 die der Einzelkomponenten. Die Streptokokken wurden bei 37°C ohne Schütteln in C-Medium angezogen.

Tab. 2.16:	Zusammensetzung	des	<b>C-Mediums</b>
------------	-----------------	-----	------------------

Komponente	Menge [ml]
Pre C	400 ml
Supplement	13 ml
Adams III	10 ml
Phosphatpuffer, pH 8,0	15 ml
2 % Pyruvat	5 ml
5 % Hefeextrakt	9 ml
Glutamin (1 mg/ml)	10 ml

Tab. 2.17: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums

Komponente	Zusatz	Menge
PreC	Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
	L-Tryptophan	5 g 5 mg
	L-Cystein	50 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	pH 7,5 mit NaOH einstellen,	
	autoklavieren	
Supplement	3 in 1 salts	60 ml
	20 % Glucose	120 ml
	50 % Saccharose	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
	0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1,6 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	sterilfiltrieren und dunkeln	
	lagern	
Phosphatpuffer, pH 8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	53 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	947 ml
	autoklavieren	

Komponente	Zusatz	Menge
3 in 1 salts	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 mg
	CaCl <sub>2</sub> , wasserfrei	0,5 g
	MnSO <sub>4</sub> (0,1 M) x 4 H <sub>2</sub> O	0,2 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	autoklavieren	
Adama I	Diatio	0.15 mg
Adams I	Diouin	0,15 mg
		130 mg
	Pyridoxin-HCi (B6)	175 mg
		600 mg
	Thiamin-HCI	160 mg
	Riboflavin	70 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	sterilfiltrieren und dunkel lagern	
Adams II	Faso v7H.O	500 mg
	$CusO_4 \times 5 H_2O$	500 mg
	$7nSO_{1} \times 7H_{2}O$	500 mg
		200 mg
		200 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	sterilfiltrieren und dunkel lagern	

#### 2.4.1.2 D-Blutagar

Zur Anzucht von Streptokokken auf Festmedium wurde D-Agar (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.18) mit Zusatz von Schafsblut (Brown, 1919) verwendet. Dem autoklavierten und auf ca. 48°C abgekühlten D-Agar wurde 3 % Schafsblut (Oxoid GmbH, Wesel) zugegeben, gemischt und je ca. 20 ml davon in sterile Petrischalen gegossen. Bei Bedarf wurden Antibiotika (Tab. 2.21) in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

Tab. 2.18: Zusammensetzung von D
----------------------------------

Komponente	Menge
Glucose	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml, autoklavieren

#### 2.4.2 Nährmedien zur Anzucht von E. coli

*E.coli*-Zellen wurden in Luria-Bertani-(LB) Medium (Sambrook *et al.*, 1989) unter Schütteln bei 37°C angezogen. Zur Anzucht auf Festmedium wurde LB-Agar hergestellt durch

Versetzen des LB-Mediums mit 1,5 % Agar. Bei Bedarf wurden Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

Komponente	Menge
Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Hefe Extrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml, autoklavieren

#### Tab. 2.19: Zusammensetzung LB-Medium

#### Tab. 2.20: Zusammensetzung LB-Agar

Komponente	Menge
Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Hefe Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml, autoklavieren

### 2.5 Antibiotika

Die in Tabelle 2.21 aufgelisteten Antibiotika wurden in den angegebenen Stammlösungen hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Antibiotika entsprechend verdünnt und zu den Festmedien zugegeben.

Tab. 2.2	21: V	erwendete	Antibiotika
----------	-------	-----------	-------------

Antibiotika	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel
Ampicillin	100	100	H <sub>2</sub> O
Cefotaxim	10	variabel	H <sub>2</sub> O
Piperacillin	10	variabel	H <sub>2</sub> O
Spectinomycin	20	80	H <sub>2</sub> O
Oxacillin	10	variabel	H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	20	20	H <sub>2</sub> O:Ethanol (50:50)
Penicillin G	10	variabel	H <sub>2</sub> O
Trimethoprim	15	15	DMSO

## 2.6 Mikrobiologische Methoden

#### 2.6.1 Anzucht und Wachstum von E. coli

*E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Es wurde entweder aus einer flüssigen Vorkultur oder mit Kolonien von einer Agarplatte angeimpft.

Zum Wachstum auf Festmedien wurden Glycerinkulturen bzw. Kolonien mit der Impföse oder mit einem sterilen Zahnstocher auf dem Agar ausgestrichen. Alternativ wurden kleine Mengen der Flüssigkultur mit einem Drigalski-Spatel auf dem Agar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C.

Das Wachstum von *E. coli* wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Photometer verfolgt.

#### 2.6.2 Stammkonservierung von E. coli

Zur dauerhaften Konservierung von Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 1 ml der exponentiell wachsenden Bakterienkultur mit 200 µl Glycerin (99,5 %) vermischt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren wurde. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C. Um die Reinheit der Glycerinkulturen zu überprüfen, wurden diese auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

#### 2.6.3 Transformation von E. coli

#### 2.6.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen erfolgte nach der von Hanahan (1983) beschriebenen Methode.

Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Übernachtkultur in 10 ml LB-Medium angelegt und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. 2 ml der bewachsenen Übernachtkultur wurden in 200 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,7 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in Nalgene Zentrifugenbecher umgefüllt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in der Beckman Zentrifuge J2-21 5 min bei 4°C und 6.000 rpm im JA-10 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 80 ml kaltem TFB1 Puffer (Tab. 2.22) resuspendiert. Nach einer 5-minutigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen noch mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml kaltem TFB2 (Tab. 2.22) Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 100 µl in zuvor gekühlten ERGs (Eppendorf Reaktions Gefäß) aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer	Komponenten	Menge
TFB1	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Glycerin	15 %
	Millipore H <sub>2</sub> O	ad 800 ml
	pH 5,8 mit Essigsäure	
	einstellen, sterilfiltrieren	
TFB2	MOPS	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 %
	pH 6,5 mit KOH einstellen	

Tab. 2.22: Zur Transformation von E. coli eingesetzte Lösungen

#### 2.6.3.2 Transformation

Zur Transformation (Chung *et al.*, 1989) wurden 100  $\mu$ l kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 0,5-1  $\mu$ l Plasmid-DNA (Konz. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) bzw. 5-10  $\mu$ l Ligationsansatz zu den Zellen gegeben und gemischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gehalten, danach für 90 s bei 42°C im Wasserbad hitzebehandelt und sofort wieder auf Eis gestellt. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium vermischt, in Glasröhrchen überführt und 1 h bei 37°C und 250 rpm schüttelnd inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in einem ERG überführt und ca. 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in ca. 100  $\mu$ l Restmedium resuspendiert und auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

#### 2.6.4 Anzucht und Wachstum von S. pneumoniae und S. oralis

Zur Anzucht von Streptokokken in Flüssigkultur wurde C-Medium verwendet. Im Allgemeinen wurden 6 ml des Mediums mit 100 µl einer Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um eine Autolyse nach Erreichen der stationären Phase bei Übernachtkulturen zu vermeiden, wurden die Kulturen am Vorabend in ein Eisbad gestellt, wobei der Start der Inkubation mittels einer Zeitschaltuhr erfolgte. In der exponentiellen Phase wurden die Kulturen in frisches C-Medium überimpft (1:20 Verdünnung) und weiter inkubiert.

Das Wachstum der Streptokokken wurde über die durch die Zelldichte verursachte Lichtstreuung (Nephelo N) der Kultur mittels eines Nephelometers (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems LTD) gemessen. Dabei diente das unbewachsene Medium als Nullwert und ein Glaseinsatz, welcher einer Zelldichte von Nephelo=131,2 entsprach, als Referenz.

Zum Wachstum auf Festmedium wurde mit einer sterilen Impföse etwas Glycerinkultur entnommen und auf einer D-Blutagarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert.

#### 2.6.5 Stammkonservierung von S. pneumoniae und S. oralis

Von den verwendeten Stämmen wurden aus einer exponentiell wachsenden Kultur Glycerinkulturen zur Aufbewahrung angelegt. Bei einem Nephelowert zwischen 50 und 60 wurde 1 ml der Kultur mit 200 µl Glycerin (99,5 %) in einem ERG gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

#### 2.6.6 Transformation von S. pneumoniae

#### 2.6.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Da Pneumokokken natürlich kompetent sind, können sie in einer Phase ihres Wachstums DNA aufnehmen (Tomasz und Hotchkiss, 1964). Die maximale Kompetenz wird in der midexponentiellen Wachstumsphase erreicht. Aus diesem Grund wurden zur Herstellung kompetenter Pneumokokken-Zellen 12 ml C-Medium mit 9 µl/ml 8 % BSA 1:20 aus einer Vorkultur beimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer Zelldichte von Nephelo 30 wurden je 100 µl der Kultur mit je 20 µl Glycerin (99,5 %) vermischt, sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.6.6.2 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um zu überprüfen, bei welcher Zelldichte die in dieser Arbeit hergestellten *S. pneumoniae* Derivate ihre kompetente Phase haben, wurden Transformationseffizienztests durchgeführt.

Dazu wurde wie in 2.6.6.1 beschrieben, eine Vorkultur des zu testenden Stammes angesetzt und bei Erreichen der Log Phase 1:20 mit C-Medium, versetzt mit 9 µg/ml 8 % BSA verdünnt. Ab einer Zelldichte von N=10 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase (entweder alle 30 min oder bei definierten Zelldichten) 100 µl entnommen, mit 20 µl Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Transformation wurden 180 µl C-Medium mit 1,62 µl 8 % BSA mit 20 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen und 100 ng chromosomaler *S. pneumoniae* amiA9-DNA (Strep<sup>R</sup>) vermischt. Die Ansätze wurden zur Aufnahme der DNA 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die anschließende Inkubation von 2 h bei 37°C dient der phänotypischen Expression der Resistenz.

Die Transformationsansätze wurden verdünnt und jeweils 100  $\mu$ l bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup> auf Blutagarplatten mit Streptomycin (200  $\mu$ g/ml) und bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup> auf Blutagarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert.

Nach 24h wurden die Zahl der Transformanten und die Lebendkeimzahl bestimmt. Somit ließ sich die Effizienz E nach folgender Formel berechnen:

 $E[\%] = \frac{NT}{NL} \times 100$ 

- E = Transformationseffizienz [%] NT = Zahl der Transformanten bezogen auf 1 ml Kultur
- NL = Lebendkeimzahl in 1 ml Kultur.

#### 2.6.6.3 Transformation

Zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* wurden im Allgemeinen 100-150 ng DNA eingesetzt. Die Durchführung der Transformation erfolgte wie in 2.6.6.2 beschrieben. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf D-Blutagarplatten mit entsprechenden Antibiotika. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit TE-Puffer statt DNA. Die Platten wurden bei 37°C 24-48 h inkubiert. Einzelkolonien wurden mittels eines sterilen Glasstabs gepickt und sowohl auf Platten mit Antibiotikum (Selektionskonzentration) als auch auf Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen.

#### 2.6.7 Mikroskopie

Um mögliche morphologische Veränderungen bzw. Verunreinigungen der in dieser Arbeit verwendeten Stämme festzustellen, wurden diese einer mikroskopischen Analyse unterzogen. Dazu wurden je 10 µl der exponentiell wachsenden Kulturen durch ein 100 X Objektiv (Plan Apo, Nikon Eclipse E600) begutachtet und eventuell mittels einer Kamera dokumentiert (CCD1300B, VDS Vosskühler GmbH).

#### 2.6.8 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als minimale Hemmkonzentration bezeichnet man die geringste Antibiotikakonzentration, bei der gerade kein Bakterienwachstum mehr möglich ist (De Gruyter, 1994). Zur Bestimmung der MHK der in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden zwei Methoden angewandt.

#### 2.6.8.1 E-Test

Durch die Verwendung von Antibiotikateststreifen wird die Einschränkung des Resistenz-Konzentrationsbereiches des zu testenden Stammes ermöglicht. Zur genaueren Bestimmung der MHK wurden in diesem Bereich mehrere Konzentrationen mittels der Agardilutionsmethode (2.6.8.2) getestet.

Es wurden verschiedene Antibiotikateststreifen (Oxoid GmbH) verwendet, deren Konzentrationsbereiche in Tabelle 2.23 aufgelistet sind.

Antibiotikum	Konzentrationsgradient [µg/ml]
Cefotaxim	0,002-32
Oxacillin	0,016-256
Penicillin G	0,002-32
Piperacillin	0,016-256
Tetracyclin	0,016-256

Tab. 2.23: Getestete E-Teststreifen zur Bestimmung der MHK

Es wurden 30 ml Blutagar in eine große, viereckige Platte gegossen. Von dem zu testenden Stamm wurden 100 µl (Nephelo 60-80) ausplattiert und die Teststreifen mittels einer Pinzette luftblasenfrei auf die Platte gelegt. Inkubiert wurde bei 37°C und ausgewertet nach 24 h und 48 h. Der MHK-Wert entsprach der Stelle, wo der Hemmhof den Teststreifen schneidet.

#### 2.6.8.2 Agardilutionsmethode

Bei der Durchführung des Agardilutionstests (Andrews, 2001) wurden Blutagarplatten mit steigender Antibiotikakonzentration gegossen, deren Abstufung je nach Antibiotikum in 0,01er, in 0,1er oder 1er Schritten erfolgte. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurden die Stammlösungen der verwendeten β-Laktamantibiotika ausreichend verdünnt. Das Antibiotikum wurde in der entsprechenden Konzentration unmittelbar vor dem Gießen zu dem flüssigen D-Agar gegeben. Nach Zugabe von 3 % Schafsblut wurde gemischt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C in C-Medium bis zu einem Nephelowert von 30 (entspricht etwa 1,5\*10<sup>8</sup> cfu/ml) angezogen. Die Kulturen wurden auf die Platten aufgetropft. Die Platten wurden so lange angetrocknet bis keine Tropfen mehr auf der Plattenoberfläche zu sehen waren. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubation von 24 h (48 h) bei 37°C. Das Wachstum weniger einzelner Kolonien wurde als Inhibition betrachtet.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

#### 2.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus S. pneumoniae

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* wurde eine Methode angewendet, die auf der Methode von Marmur basiert (Marmur, 1961).

10 ml einer S. *pneumoniae* Kultur wurden bei einem Nephelowert von 70-90 durch Zentrifugation von 10 min bei 8.000 rpm und 4°C geerntet (Hereus Biofuge stratos, Rotor 3046). Das Bakterienpellet wurde in 1 ml kalter 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert, in ein ERG überführt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Hermle Z233 M-2). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 180 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum Verdau der RNA wurden 20 µl RNase A Lösung (10 mg/ml) zugegeben. Sofort danach wurden zur Zelllyse 200 µl 2 %-igem SDS pipettiert, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und bis zur

vollständigen Lyse bei 37°C inkubiert. Den vollständig lysierten Zellen wurden 100 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Applichem, Darmstadt) zugegeben, gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde von den Proteinen über eine Phenolextraktion gereinigt. Dazu wurden 500 µl Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und der Ansatz auf einem Eppendorf-Schüttler 30 min bei Raumtemperatur (RT) gerüttelt. Nach einer 2-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die wässrige Oberphase mit den gelösten Nukleinsäuren abgenommen und die Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol Extraktion wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war.

Anschließend wurde eine Isopropanol-Fällung durchgeführt. Die Oberphase wurde mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde zweimal mit 200 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und in der Speed-Vac (Univapo 100 H) getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50-100 µl TE-Puffer 1 h bei 37°C im Wasserbad gelöst. Die isolierte DNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt. Die zur Isolierung chromosomaler DNA verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.24 zusammengestellt.

Lösung	Komponenten	Menge/Konzentration
NaCl		0,9 %
TE-Puffer	Tris-HCI, 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 (C. Roth)	15 mM
	15 min bei 100°C kochen, auf RT	
	abkühlen lassen, bei -20°C lagern	
SDS		2 %
Proteinase K (Applichem)		
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Phenol	25 Vol.
(2012-11)	Chlorophorm	24 Vol.
	Isoamylalkohol	1 Vol.
	Bei 4°C dunkel lagern	
Isopropanol p.a.		100 %
EtOH p.a.		70 %

#### Tab. 2.24: Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus S. pneumoniae

#### 2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus S. oralis

Da S. *oralis* eine andere Zellwandzusammensetzung als *S. pneumoniae* aufweist und aus diesem Grund diese schwieriger aufzuschließen ist, wurden zur Lyse zusätzlich die lytischen Enzyme Lysozym (Applichem, Darmstadt) und Mutanolysin (Sigma Aldrich GmbH, Deideshofen) verwendet. Im Grunde erfolgte die DNA-Isolation wie im Abschnitt 2.7.1. beschrieben mit der Ausnahme, dass nach RNase A-Zugabe zusätzlich 90 µl Lysozym (25 mg/ml) und 5 µl Mutanolysin zugegeben wurden.

#### 2.7.3 Plasmid-Mini-Präparation aus E. coli

Zur Plasmidisolierung von *E. coli* wurde die folgende Methode (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt.

Von *E. coli* Stämmen aus denen Plasmide isoliert werden sollten wurden Übernachtkulturen hergestellt, indem jeweils eine Kolonie der Platte mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein Glasröhrchen mit 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt wurde. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis eine deutliche Trübung sichtbar war.

Die Kulturen wurden 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl GTE versetzt und durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter 1 % SDS/0,2 M NaOH-Lösung wurden die resuspendierten Zellen durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die Zugabe von SDS führt zur Zelllyse, von Natriumhydroxid zur DNA-Denaturierung. Nach dem Neutralisieren durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat mit pH 5,2 wurde die DNA mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (30 s vortexen). Durch die nachfolgende Zentrifugation von 2 min bei 14.000 rpm wurden die Zellmembranreste, chromosomale DNA und denaturierte Proteine abgetrennt. Die obere, wässrige Phase mit der gelösten DNA wurde zu 1 ml 96 % EtOH in ein neues ERG gegeben. Das ERG wurde mehrmals über Kopf geschwenkt, 1 min bei RT inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen und weitere 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in der Speed-Vac (Univapo 100 H) getrocknet und anschließend in 50 µl TE/RNase A-Lösung aufgenommen. Zum Lösen des Pellets wurde 3 min bei 55°C auf dem Thermomixer und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dieser Schritt diente auch dem Verdau der RNA durch die RNase. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Lösung	Komponente	Konzentration/Volumen
GTE-Lösung	Glucose Tris pH 8,0	50 mM 25 mM
	EDTA	10 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 500 ml
1 % SDS/0,2 M NaOH	SDS 10 %	100 µl
	NaOH 1 M	200 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 µl
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Phenol	25 ml
	Chloroform	24 ml
	Isoamylalkohol	1 ml
TE-Puffer pH 8,0	Tris pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
TE/RNase A-Lösung	RNase A (1 mg/ml)	5 µl
	TE Puffer pH 8,0	95 µl
Natriumacetat pH 5,2		3 M
Ethanol		100 % / 70 %

Tab. 2.25: Verwendete Lösungen zur Plasmidisolierung

#### 2.7.4 Plasmid-Midi-Präparation aus E. coli

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus einer 50 ml Kultur mit Hilfe des NucleoBond® PC 100 Kit (Macherey-Nagel) mit dem Protokoll für High Copy Plasmide nach Herstellerangaben isoliert.

#### 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Je nach Agarosekonzentration bilden sich in den Agarosegelen unterschiedlich große Poren aus. Mit Hilfe der Vernetzung in der Gelmatrix können unterschiedliche DNA-Stücke nach ihrer Größe aufgetrennt werden, indem in einem elektrischen Feld die negativ geladene DNA zur Anode wandert. Kleinere DNA-Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel als größere.

Die Agarosekonzentration wurde abhängig von der Größe des aufzutrennenden Fragmentes gewählt. Im Allgemeinen betrug diese 1 %, bei kleineren DNA-Fragmenten 1,5 %-2 %.

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose (SeaKem LE, Biozym) in 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellenherd durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C in die Elektrophoresekammer gefüllt. Es wurde ein Plexiglaskamm eingesetzt, der nach dem Aushärten des Gels wieder entfernt wurde und so die Geltaschen erzeugte. Nach Erhärten des Gels wurde die Gelkammer in die mit TAE-gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt.

2 µl der DNA wurden mit 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas) gemischt und in die Taschen gegeben. Als Größenstandards wurden GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder oder bei kleineren Fragmenten GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet. Nach dem Gellauf wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) für 15-30 min gefärbt und kurz in Wasser entfärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und fluoresziert dadurch bei Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm. Auf einem UV-Transilluminator (Oncor® M-20, Appligene) konnten die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden (Emmissionswellenlänge 590 nm). Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (Video copy Processor P68E, Mitsubishi).

Puffer	Komponente	Konzentration/Volumen/Menge
TAE-Puffer (50x)	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	Vor Gebrauch 1:50 verdünnen	
Ethidiumbromid		0,5 µg/ml

Tab. 2.26: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

#### 2.7.6 DNA-Elution aus Agarosegelen

PCR-Produkte, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten sowie enzymatisch verdaute Plasmide und DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen isoliert, um unerwünschte PCR-Produkte und DNA-Stücke, entstanden durch den enzymatischen Verdau, zu entfernen.

Es wurden Gele mit größeren Taschen, entsprechend dem aufzutragenden Volumen, gegossen. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Gel und die anschließende Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben.

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

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, lineare doppelsträngige DNA-Fragmente zu amplifizieren. An der Reaktion sind zwei Oligonukleotide (Primer) gegensätzlicher Orientierung beteiligt, die sich jeweils an das 3`-Ende eines der beiden DNA-Einzelstränge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes anlagern. Die Primer sind in der Regel 20-30 Nukleotide lang und flankieren den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt einer Template-DNA, welcher bei der Reaktion mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase amplifiziert wird. Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen (94-98℃) in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Im zweiten Schritt kommt es durch herabgesetzte, vom GC-Gehalt und Länge der Primer abhängige Temperatur zu einer Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA (Annealing). Im letzten Schritt fügt eine DNA-Polymerase das entsprechende Desoxyribonukleotid an das 3'-OH-Ende des Primers an und ermöglicht somit die Neusynthese des DNA-Doppelstranges (Elongation) mit Hilfe der vier Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs). Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und ist unterschiedlich je nach verwendeter Polymerase.

Durch vielfache Wiederholung dieser drei Schritte (im Allgemeinen 30-34fach) kann man von einem DNA-Fragment in sehr geringer Menge eine hohe Anzahl von Kopien erhalten.

Für die Amplifikation der DNA wurden verschiedene Thermocycler der Firma Biometra (TGradient Thermocycler, T1Thermocycler) verwendet.

Die PCR wurde mit der GoldStar<sup>™</sup> DNA-Polymerase (Eurogentec) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* durchgeführt, wenn die amplifizierten Fragmente nicht zur Klonierung eingesetzt wurden. Diese Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion (proof reading, 3´-5´-Exonukleaseaktivität) und die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden liegt bei ca. 8 x 10<sup>-6</sup>. Die Tabellen 2.27 und 2.28 zeigen die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes und das Programm für die GoldStar<sup>™</sup> DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen [µl] für einen Ansatz
H <sub>2</sub> O	35,5
10x Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
dNTP-Mix (10 mM)	2
Template DNA (0,2 μg/μl)	1
Goldstar Polymerase 5 U/µI	0,5
Primer 1 (10 pmol/µl)	1
Primer 2 (10 pmol/µl)	1

Tab. 2.27: Reaktionsansatz der GoldStar™ DNA-Polymerase

Tab. 2	.28: F	PCR-Programm	der	GoldStar™	<b>DNA-Pol</b>	ymerase
--------	--------	--------------	-----	-----------	----------------	---------

Schritte	Temperatur in [°C]	Zeit in [s]
1 Denaturierung	96	120
2 Denaturierung	96	30
3 Annealing	T <sub>m</sub> der Primer - 5℃	60 (je kb)
4 Elongation	72	60
5 Elongation	72	240
6 Pause	10	$\infty$

Die Schritte 2 bis 4 wurden 34 Mal wiederholt.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde die iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion besitzt. Ansatz und Programm für diese DNA-Polymerase sind aus den Tabellen 2.29 und 2.30 zu entnehmen.

Komponente	Volumen [µl] für einen Ansatz
H <sub>2</sub> O	32,5
5x iProof HF Puffer	10
dNTP-Mix (10 mM)	1
Template DNA (1 µg/µl)	1
iProof Polymerase (2 U/µI)	0,5
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5

Tab. 2.29:	Reaktionsansatz	der iProc	f Hiah Fi	delitv Pol	vmerase

Tab. 2.30: PCR-Programm der iProof High Fidelity Polymerase

Schritte	Temperatur in [°C]	Zeit in [s]
1 Denaturierung	98	120
2 Denaturierung	98	10
3 Annealing	T <sub>m</sub> der Primer - 5°C	30 (je kb)
4 Elongation	72	50
5 Elongation	72	240
6 Pause	10	$\infty$

Die Schritte 2 bis 4 wurden 34 Mal wiederholt.

#### **Kolonie-PCR**

Eine Kolonie-PCR mit *E. coli*-Klonen wurde als Kontrolle bei Klonierungen durchgeführt. Hierbei wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Klons mit einem sterilen Zahnstochers gepickt und in einem Standardansatz mit der GoldStar™ DNA-Polymerase gegeben.

#### Kultur-PCR

Bei *S. pneumoniae*-Transformanten wurde eine Kultur-PCR durchgeführt, um so beispielsweise die Integration von Plasmiden überprüfen zu können. Dazu wurden 100 µl Kultur Glycerinkultur für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und 1 µl dieser Lösung wurde als Template in einem Standard PCR-Ansatz mit der GoldStar<sup>™</sup> DNA-Polymerase eingesetzt.

#### 2.7.8 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

PCR-Ansätze enthalten DNA-Polymerasen, Salze und Oligonukleotide. Eine zu hohe Ionenkonzentration kann weitere enzymatische Reaktionen hemmen. Deshalb wurden störende Bestandteile der PCR- oder Restriktionsansätze mittels Jet-Quick PCR-Purification Spin Kit 250 (Genomed, Löhne), Ron's PCR-Pure Kit (Bioron, Ludwigshafen) oder NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) entfernt. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.7.9 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde photometrisch mit dem Nano-Drop®ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.) bestimmt. Hierzu wurde 1 µl einer DNA-Lösung auf das Ende einer optischen Kabel-Faser pipettiert (receiving fiber). Eine zweite optische Kabel-Faser (source fiber) wird mit der Probe in Kontakt gebracht, die DNA-Lösung bildet somit die Verbindung zwischen den beiden optischen Fasern. Das Gerät verwendet einen 0,2 mm Path (Schichtdicke der Probe), um die Absorption zu kalkulieren. Es wird die Absorption bei 260 bzw. 280 nm gemessen. Das Verhältnis 260:280 gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Eine reine DNA-Probe ist gekennzeichnet durch eine 260:280-Ratio von >1,8. Ist die DNA-Probe mit Proteinen verunreinigt, liegt die Ratio niedriger. Das Verhältnis 260:230 gibt Auskunft über eine Verunreinigung mit Phenol.

#### 2.7.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktionen wurden durch die Seq-IT GmbH & Co. KG in Kaiserslautern durchgeführt. Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden zuvor mittels Jet Quick PCR Purfication Kit (Genomed) oder dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgereinigt (2.7.8). Zur Weiterbearbeitung wurden ca. 1 µg der aufgereinigten Probe und die dazu benötigten Primer an das Institut versendet.

Die Sequenzierreaktionen wurden nach einer Methode durchgeführt, die auf der von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelten Kettenabbruchmethode basiert.

Dabei werden in einem Ansatz die zu sequenzierenden DNA, der jeweiligen Primer, die DNA-Polymerase und ein Nukleotidgemisch aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und fluoreszenzmarkierten 2'3'Didesoxynukleosidtriphosphat gegeben. Die ddNTPs werden nun während der DNA-Synthese willkürlich in den neusynthetisierten Strang eingebaut. ddNTPs fehlt am C(3) der Ribose die Hydroxyl-Gruppe. Wenn ein ddNTP in die wachsende Polypeptidkette eingebaut wird, bricht die Amplifikation des DNA-Stranges ab, da keine 3'OH-Gruppe mehr vorhanden ist. Es entstehen somit unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die endständig fluoreszenzmarkiert sind. Dieses Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Ketten kann nun mittels einer Elektrophorese aufgetrennt werden. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können die DNA-Fragmente in nur einem Lauf durch einen Argon-Ionen-Laser, welcher die ddNTPs zur Fluoreszenz detektiert werden. Mittels Computersoftware anregt, werden die Fluoreszenzsignale detektiert und können mit der entsprechenden Software ausgewertet werden.

Die fertigen Sequenzdaten wurden vom Institut in Form einer seq-Datei (Textdatei) und einer ab1- Datei versendet. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe folgender Computersoftware:

- → Clone Manager 7.0, Scientific and Educational Software
- → Chromas v 1.45; 1996-1998 Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia
- → Mutalin (http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html, Corpet, 1988)

#### 2.7.11 Enzymreaktionen mit DNA

#### 2.7.11.1 Restriktion von Nukleinsäuren

DNA kann mit Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Basensequenzen in Nukleinsäuren und können diese schneiden. Dabei entstehen je nach Enzym überhängende Enden (sticky ends) oder Enden ohne Überhänge (blunt ends).

Verwendet wurden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt). Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer zu den jeweiligen Enzymen verwendet. Zur analytischen Spaltung wurden 1 µl DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut, zur präparativen Spaltung wurden 5 µg Vektor-DNA bzw. 30 µl PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (2.7.5). Sollte die DNA im Folgenden in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, so wurden die Ansätze mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) über ein Agarosegel aufgereinigt (2.7.6).

#### 2.7.11.2 Ligation

Ligasen sind Enzyme, die DNA-Fragmente verbinden. Die T4-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen in Anwesenheit von ATP zwischen doppelsträngiger DNA mit 3` Hydroxyl- und 5` Phosphat-Enden.

Verwendet wurde die T4-Ligase (1 U/µl, Invitrogen). Bei Ligationen mit linearisierten Plasmiden wurde das Insert in 3-fachen Überschuss eingesetzt. Sollten zwei PCR-Produkte nach der Restriktion ligiert werden, so wurden sie in gleichen Mengen eingesetzt. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist aus Tab. 2.31 zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

Komponente	Menge
Insert-DNA	xμl
Vektor-DNA	x µl
T4-Ligase	1 µl
T4-Ligasepuffer (5 x)	4 µl
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	20 µl

#### Tab. 2.31: Ligationsansatz

### 2.8 Biochemische Methoden

## 2.8.1 Herstellung von Zelllysaten und Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen

Zur Visualisierung von PBPs aus verschiedenen Stämmen von *Streptococcus pneumoniae* wurden diese mit Bocillin (Molecular Probes), einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat markiert (Zhao *et al.,* 1999). Es bindet PBPs, die dadurch unter dem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) sichtbar werden. Zur Lysatherstellung wurden die entsprechenden Stämmen in 6 ml C-Medium bei 37°C bis zu einem Neph elowert von ca. 80 angezogen. Anschließend wurden diese bei 8.000 rpm und 4°C 10 lang min zentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos Zentrifuge, Rotor 3046) und der Überstand komplett verworfen.

Um Veränderungen bei Proteinmenge oder bei der Affinität der PBPs zu Bocillin feststellen zu können, sollten bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese immer die gleichen Mengen an Lysat aufgetragen werden. Zu diesem Zweck wurde die einzusetzende Menge an 20 mM Natriumphosphatpuffer (+ 0,2 % Triton X-100) (Tab. 2.32), in dem die Pellets resuspendiert wurden, folgenderweise berechnet:

Menge an Natriumphosphatpuffer [ml] = Kulturvolumen [ml] x  $\frac{\text{tats.Nephelo}}{20}$  x 5 µl

Somit entsprachen 5 µl resuspendierte Zellen 1 ml Kultur bei einem Nephelowert von 20.

Die Pellets wurden in der so berechneten Menge an 20 mM Natriumphosphatpuffer (+ 0,2 % Triton X-100) resuspendiert. Das Detergenz Triton X-100 zerstört die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran und aktiviert Autolysin, was zur Zelllyse führt. Da Triton X-100 nicht ausreichend ist für die Lyse von *S. oralis*-Zellen, wurde dem Natriumphosphatpuffer zusätzlich 0,8 mg/ml Lysozym (Applichem, Darmstadt) und 0,5 mg/ml Cellosyl (freundliche Leihgabe der Firma Hoechst AG, Frankfurt) zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C bei *S. pneumoniae*-Stämmen, wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gela gert. *S. oralis*-Zellen wurden ca. 1 h bei 37°C im Wasserbad lysiert und anschließend durch ei nen wiederholten Einfrier-Auftau-Zyklus in flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Bis zur weiteren Verwendung wurden auch diese Zellen bei -80°C gelagert. Die Markierung der PBPs erfolgte wie folgt: 5  $\mu$ l Lysat wurden mit 3  $\mu$ l 10  $\mu$ M Bocillin vermischt und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 8  $\mu$ l 2-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95°C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf ein Gel geladen.

Die Bocillingele wurden nach der Gelelektrophorese auf dem FluorImager 595 bei einer Wellenlänge von 488 nm gescannt, anschließend folgte die Coomassie-Färbung dieser Gele, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Komponente	Konzentration/Volumen
NaH2PO4 (1 M)	42,3 ml
Na2HPO4 (1 M)	57,7 ml
H <sub>2</sub> 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))	

Tab. 2.32: Zusammensetzung de	s Natriumphosphat-Puffers
-------------------------------	---------------------------

#### 2.8.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) ist es möglich, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. SDS bindet an die hydrophoben Regionen eines Proteins, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren. Durch diese irreversible Anlagerung an die Proteine werden nichtkovalente Wechselwirkungen und somit die Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Dieser Komplex aus SDS und denaturiertem Protein ist stark negativ und überdeckt die Eigenladungen des Proteins. Dadurch wandert der Protein-SDS-Komplex in einem elektrischen Feld zum Plus-Pol, wobei die Auftrennung aufgrund des Molekulargewichtes der Proteine erfolgt. Als Molekulargewichtsstandard wurde entweder ein peqGOLD ProteinMarker II (peqlab) oder bei Gelen, die geblottet werden sollten der peqGOLD ProteinMarker IV verwendet.

Die verwendeten SDS-Gele bestehen aus einem kurzen, weitporigen Sammelgel, wo eine Konzentrierung der Proteine stattfindet, und einem langen, engporigen Trenngel, wo die Proteine nach der von ihrem Molekulargewicht abhängigen elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt wurden. Als Gelmatrix dient dabei ein dreidimensionales Netzwerk aus Polyacrylamid. Polyacrylamid wird durch eine radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden Methylenbisacrylamid hergestellt, wobei der Anteil an Bisacrylamid den Grad der Vernetzung und damit die Porengröße der Matrix bestimmt.

Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist aus Tabelle 2.33 bzw. 2.34 zu entnehmen.

% Gele	-	11	12,5	15	
H <sub>2</sub> O	(ml)	1,82	1,55	1,15	
30 % AA:0,8 % BAA	(ml)	1,83	2,05	2,5	
1,5 M Tris pH 8,8	(ml)	1,25	1,25	1,25	
10 % SDS	(µI)	50	50	50	
10 % APS	(µI)	25	25	25	
TEMED	(µI)	2,5	2,5	2,5	

Tab. 2.33: Ansatzschema für ein kleines Trenngel

AA= Acrylamid

BAA= Bisacrylamid

APS = Ammoniumpersulfat,

TEMED = Tetramethylethylendiamin

Tab. 2.34: Ansatzscher	na für ein kleiı	nes Sammelgel
------------------------	------------------	---------------

% Gel		5
H <sub>2</sub> O	(ml)	2,85
30 % AA:0,8 % BAA	(ml)	0,85
0,5 M Tris pH 6,8	(ml)	1,25
10 % SDS	(µI)	50
10 % APS	(µI)	25
TEMED	(µl)	2,5

Zur Auftrennung von Zelllysaten wurden entweder 7,5 %-ige Gele (für bessere Auftrennung von PBP1a und PBP2b) oder eine Spezialmischung mit 0,275 % BAA statt 0,3 % im Trenngel (zur besseren Auftrennung von PBP2x, PBP2a und PBP2b) verwendet. Tabelle 2.35 zeigt die Zusammensetzung der Gele.

	Tab.	2.35:	Zusammensetzung	der	Trenngele zur	Auftrennung	von Zelllysaten
--	------	-------	-----------------	-----	---------------	-------------	-----------------

%-iges- Trenngel		7,5	7,5 (zur besseren Auftrennung von PBP2)
H <sub>2</sub> O	(ml)	2,43	7
Rotiphorese ®Gel 30*	(ml)	1,25	-
Rotiphorese® Gel A**	(ml)	-	5
Rotiphorese® Gel B***	(ml)	-	2,75
1,5 M Tris, pH 8,8	(ml)	1,25	5
10 % SDS	(µI)	50	200
10 % APS	(µl)	25	50
TEMED	(µl)	2,5	5

\* entspricht 37,5 % AA (= Acrylamid) / 1 % BAA (= Methylenbisacrylamid), C. Roth GmbH & Co

\*\* 30 % Acrylamidlösung, C. Roth GmbH & Co

\*\*\* 2 % Bisacrylamidlösung, C. Roth GmbH & Co

#### 2.8.3 Herstellung von SDS-Gelen

Zur Herstellung kleiner Gele wurden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und mit Spacern in eine Minigel-Apparatur (Biorad) gespannt. Es wurde das Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels, wurde das Wasser entfernt, und das Sammelgel gegossen. Ein Kamm, der Taschen mit einem Volumen von ca. 20 µl in das Obergel einfügt, wurde in das Sammelgel eingesteckt bis das Gel polymerisiert war.

Zum Gießen von großen Gelen wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt, mit Spacern und je 2 Klammern auf jeder Seite zusammengesetzt. Die somit fixierten Glasplatten wurden in einen zuvor mit flüssiger 1,5 %-iger Agarose gefüllten Sockel gestellt. Nach Erkalten der Agarose, mit der die Glasplatten abgedichtet wurden, wurde das Trenngel (Menge für 3 kleine Trenngele, s. Tab. 2.33) zusammenpipettiert und gegossen. Das Gel wurde anschließend mit Wasser überschichtet stehen gelassen, bis das Gel auspolymerisiert war. Nach Entfernen des Wassers wurde das Sammelgel (Menge für 2 kleine Sammelgele, s. Tab. 2.34) gegossen und der Kamm wurde luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel aus dem Agarose-Sockel genommen und in die Elektrophorese-Apparatur (Apparatur Eigenbau "Berlin") eingebaut. Wurden die Gele nicht sofort gebraucht, wurden sie in feuchte Tücher verpackt und bei 4°C gelagert.

Zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele in die entsprechende Apparatur eingebaut, und die Kammer wurde mit 1x Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Nach Beladung der Proben auf das Gel wurde die Gelelektrophorese von kleinen Gelen bei 100 V, und bei großen Gelen bei 35 mA durchgeführt.

#### 2.8.4 Färbung der SDS-Gele mittels Coomassie-Färbung

Die Proteine wurden nach der SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Dieses besteht aus einem sauren Farbstoff, der Komplexe mit den Proteinen bildet, wodurch diese blau hervortreten. Zunächst wurde das Gel ca. 1 h mit der Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel 1-2 h im Entfärber 1 entfärbt. Der verbleibende überschüssige Farbstoff wurde mit Entfärber 2 über Nacht entfärbt. Die Zusammensetzung der Färbelösung und den Entfärbern ist der Tabelle 2.36 zu entnehmen.

Puffer	Komponente	Konzentration/Volumen
5x Laemmli-Laufpuffer	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 2000 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie R-250	2 g
	Coomassie G-250	50 mg
	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	üN in geschlossenem Gefäß rühren, filtrieren	
Entfärber 1	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
Entfärber 2	Methanol	100 ml
	Essigsäure	50 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

Tab. 2.36: Verwendete Puffer für die SDS-Gelelektrophorese

#### 2.8.5 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Mittels Western-Blot werden Proteine nach einer Trennung durch SDS-PAGE auf eine Membran transferiert, um eine anschließende Detektion mit spezifischen Antikörpern zu ermöglichen. Zunächst wurde die PVDF-Membran (Rothi®-PVDF, C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe) auf Gelgröße zugeschnitten, mit 100 % Methanol benetzt und dadurch aktiviert. Anschließend wurde sie kurz mit Wasser abgespült. Filterpapiere (Whatman) wurden ebenfalls auf Gelgröße zurechtgeschnitten und in Blotpuffer getaucht. Der gesamte Blot wurde nun wie in Abb. 2.1 gezeigt, zusammengebaut. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel und der Membran keinerlei Luftblasen befinden, da an solchen Stellen kein Transfer stattfindet.





Das Gel befindet sich stets auf der Kathode-Seite in der Blotapparatur, die Membran auf der Seite der Anode, da durch die angelegte Spannung die Proteine von der Kathode zur Anode wandern.

Beim Western-Blot wird die Membran, auf die geblottet wird, zur Anode hin auf das Gel gelegt. Unter das Gel, sowie über der Membran befinden sich zwei Whatmanpapiere und ein Schwamm. Durch das SDS sind die Proteine negativ geladen, so dass bei Anlegen einer Spannung die Proteine von der Katode zur Anode wandern.

Geblottet wurde in einer mit Blotpuffer gefüllten Kammer. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran fand für eine Stunde bei 100 Volt unter Kühlen statt. Nach erfolgtem Blot wurde die Membran für 30 min in 15 ml PBST geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (verdünnte Antikörperlösung) überschichtet und für 1 h geschwenkt. Die Membran wurde dann zweimal für 5 min mit PBST gewaschen. Nun wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (verdünnte Antikörperlösung) 1 h inkubiert. Das Waschen erfolgte wieder mit PBST wie oben beschrieben. Um die Membran zu färben wurde diese kurz in auf 37°C vorgewärmten Blotsubstratpuffer äquilibriert. Der Blot wurde mit der frisch zusammengesetzten Blotfärbelösung überschichtet. Die Blotfärbelösung enthält die Reagenzien BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat), ein instabiles p-Toluidin Salz und NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid). Diese beiden Reagenzien bilden ein Substrat für alkalische Phosphatase, welche an den zweiten Antikörper gekoppelt ist. Durch die Enzymaktivität der Phosphatase wird die Phosphatgruppe von BCIP abgespalten. In einer darauf folgenden Redox-Reaktion wird das entstandene Produkt oxidiert und NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag, gemeinsam ergeben beide Farbstoffe eine blauviolette Färbung.

Die Färbereaktion fand für 3-15 min bei 37°C im Dunkeln statt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Blot mit  $H_2O$  gewaschen. Alle verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.37 aufgelistet.

Lösung	Komponente	Volumen/Menge
Blotpuffer	Glycin	7,2 g
	Tris	1,5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad. 1000 ml
20 x PBS (Phosphate buffered saline)	NaCl	80 g
· · · /	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad. 500 ml
	pH 7,3 einstellen, autoklavieren	
PBST	20x PBS	100 ml
	Tween 20	1 ml
	$H_2O_{bidest}$	ad. 2000 ml
Blotsubstratpuffer	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad. 500 ml
	pH 9,5 mit 1 N HCl einstellen,	
	autoklavieren	
Blotfärbelösung	Blotsubstratpuffer	9 ml
-	Stocklösung NBT/BCIP (Roche)	60 µl

## 2.9 Bestimmung von Promotor-Aktivitäten

Zur Bestimmung der Promotoraktivität von *murE* aus *S. pneumoniae* und *S. oralis* wurde das integrative Promotorprobe Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007) verwendet.

Mit Hilfe dieses Plasmides war es möglich nach Klonierung der entsprechenden Promotoren eine Aussage über ihre Stärke zu treffen, durch Messung der β-Galaktosidaseaktivität in einem modifizierten Miller-Assay.

#### 2.9.1 Das Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPP2

Zur Bestimmung von Promotoraktivitäten wurden die entsprechenden Promotorregionen in das integrative Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPP2 (Abbildung 2.2) kloniert. Das Plasmid repliziert in *E. coli* und vermittelt aufgrund des β-Laktamase Gens (*bla*) Ampicillin Resistenz in diesem Wirt, wodurch eine Selektion der Transformanten möglich ist.

Als Reportergen dient *'lacZ*, welches für die β-Galaktosidase kodiert. In pPP2 enthält das *'lacZ* Gen keinen eigenen Promotor, jedoch die Signale zur Initiation der Translation, die von dem Gen *htrA* aus *S. pneumoniae* stammen, um eine effiziente Translation von *lacZ* auch in Gram-positiven Organismen zu ermöglichen.



Abb. 2.2: Genetische Organisation des Promotor Probe Plasmids pPP2 und dessen Integration in das Genom von *S. pneumoniae.* 

Als blaue Pfeile sind die Gene zur Integration von pPP2 in *S. pneumoniae* mittels homologer Rekombination eingezeichnet. Der obere Bereich zeigt die genetische Organisation von pPP2, der untere die genetische Organisation der Region zwischen *`spr0564* und *`bgaA''* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pPP2. *bla*:  $\beta$ -Laktamase (Ampicillin Resistenz), *tetM*: Tetracyclin-Resistenz, *'lacZ*: Promotorloses Gen der  $\beta$ -Galaktosidase, *bga*: endogene  $\beta$ -Galaktosidase, MCS: Multiple Cloning Site, SD: Shine Dalgarno Sequenz.

Um die Aktivität verschiedener Promotoren zu bestimmen wurden diese als *Sphl-BamHl*-Fragmente vor das *'lacZ* kloniert. Die hergestellten Plasmidkonstrukte wurden im Anschluss in kompetente *S. pneumoniae*-Zellen transformiert. Durch homologe Rekombination über die Gene *'bgaA* und *spr0564* kommt es zur Integration in das Genom von *S. pneumoniae* (Abb.2.2). Selektioniert wurde mit Tetracyclin. Die Tetracyclin-Resistenz wird durch das Gen *tetM* aus *S. mitis* vermittelt. Die Methode zur Untersuchung der Expressionssignale ist der β-Galaktosidase-Assay (2.9.2). Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden folgendermaßen hergestellt: Die zu testenden Promotoren wurden mit einer PCR mittels iProof High Fidelity DNA-Polymerase (Bio-Rad) amplifiziert (2.7.7). Nach dem anschließenden Restriktionsverdau von PCR-Produkt und Vektor mit *SphI* und *BamHI* (2.7.11.1) wurden beide Fragmente ligiert (2.7.11.2). Nach Transformation in *S. pneumoniae* wurde die Richtigkeit der Transformanten mittels Kultur-PCR mit den Primern MCS\_fwd\_Kontr und 274\_lac überprüft.

Durch die Integration wurde das Gen der endogenen β-Galaktosidase von *Streptococcus pneumoniae* (*bgaA*) inaktiviert, womit die gemessenen Aktivitäten alleine der auf dem pPP2 kodierten β-Galaktosidase zuzuordnen waren. Die Integration in *Streptococcus pneumoniae* wurde unter Verwendung der Primerpaaren EII\_fwd\_Kontr / tetM\_rev\_Kontr und lacZ\_fwd\_Kontr / bgaA\_rev\_Kontr in einer PCR überprüft.

#### 2.9.2 β-Galaktosidaseassay

Im  $\beta$ -Galaktosidaseassay nach Miller (1972) wird das farblose chromogene Substrat o-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP) umgesetzt. ONP bewirkt dabei eine Gelbfärbung der Lösung, die proportional zur Konzentration der  $\beta$ -Galaktosidase im Reaktionsansatz ist und photometrisch bei 420 nm gemessen werden kann.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Assay entspricht im Allgemeinen dem klassischen Miller-Assay, wurde aber in einigen Punkten verändert. Im Gegensatz zum Miller-Assay, bei dem die Zellmembranen mit Hilfe von Chloroform durchlässig gemacht werden, wurde hier die spezifische Eigenschaft der Autolyse von *Streptococcus pneumoniae* ausgenutzt und diese durch die Zugabe von Triton X-100 induziert. Weiterhin handelt es sich beim Miller-Assay um ein Endpunktassay, bei dem der lineare Verlauf der Farbreaktion nicht verfolgt werden kann. In dieser Arbeit dagegen wurde der lineare zeitliche Verlauf der Farbentwicklung mittels eines Photometers verfolgt. Des Weiteren diente in dieser Arbeit nicht die Zelldichte der Kultur als Bezugsgröße für die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, sondern die Proteinmenge im Reaktionsansatz, welche mittels Bradfordassay (Bradford, 1976) gemessen wurde.

Zur Durchführung des ß-Galaktosidaseassays wurden zunächst Vorkulturen der Stämme hergestellt. Dafür wurden 500 µl einer Übernachtkultur in 10 ml auf 37°C vorgewärmtes C-Medium angeimpft und das Wachstum mittels Nephelometer (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems, London) beobachtet. Bei einer optischen Dichte von etwa N= 80, und 1-2 h nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden 2 ml der Kultur entnommen und für 3 min bei 14.000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 500 µl Lysepuffer (Tab. 2.38) resuspendiert und für

mindestens 5 min bei 37℃ inkubiert bis die vollständige Lyse beobachtet werden konnte. Nach vollständiger Lyse wurden die Ansätze auf Eis gestellt.

Für den Assay wurden 200 µl des Zellextraktes in eine Küvette der Weglänge 1 cm gegeben und in einem auf 30°C geheizten Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) für 2 min vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µl ONPG-Lösung (Tab. 2.37) gestartet. Die Absorptionsmessung bei 420 nm erfolgte über einen Zeitraum von 15 min, wobei in Intervallen von 30 s gemessen wurde. Als Referenz diente ein Ansatz aus 200 µl Lysepuffer und 800 µl ONPG-Lösung.

Die gemessenen Werte für die Absorption bei 420 nm wurden gegen die Zeit aufgetragen und aus dem linearen Bereich der Geraden die Steigung bestimmt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Zelllysat nach der Methode von Bradford. Hierfür wurde RotiQuant (Roche, Karlsruhe) verwendet, welches den

Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 enthält. Coomassie-Brillant-Blau G250 bindet in saurer Lösung stark an vorhandenen Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann die Bildung des Komplexes, was ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung darstellt, photometrisch nachgewiesen werden. Als Referenz wurde hier ebenfalls Lysepuffer verwendet.

Die Zell-Lysate wurden dafür 1:10 in Z-Puffer verdünnt. Zu diesem Ansatz wurden 700 µl Z-Puffer und 200 µl RotiQuant gegeben und der Ansatz für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen die Referenz gemessen. Anhand einer erstellten Eichgeraden mit bekannten BSA-Konzentrationen von 1-10 µg BSA konnte die Proteinmenge der jeweiligen Probe ermittelt werden.

In Anlehnung an die Berechnung der Units nach Miller (1972) wurde die ß-Galaktosidaseaktivität als Units in nmol freigesetztes ONP pro mg Protein pro Minute berechnet. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

Unit= $\frac{s \times V}{\varepsilon \times d \times m}$  [ nmol/(min x mg)] mit

d = Lichtweg = Dicke der Küvette = 1 cm  $\epsilon$  = Absorptionskoeffizient von ONP bei 420 nm= 4,5 × 10<sup>3</sup> [ $\frac{1}{mol \times cm}$ ] m = Masse des Proteins im Ansatz [mg] s = Steigung der AbsorptionsZeitGeraden  $\frac{\Delta OD420}{\Delta t}$  [1/min] V = Reaktionsvolumen = 1 ml In Tab. 2.38 sind alle für die Durchführung des ß-Galaktosidaseassays benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Puffer	Komponente	Konzentration/Menge
Z-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
	β-Mercaptoethanol	2,7 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1I
	pH 7 einstellen, bei 4°C lagern	
Lysepuffer	Z-Puffer mit Triton X-100	0,05 %
ONPG-Lösung	Z-Puffer mit ONPG	1 mg/ml

Tab. 2.38: Lösungen und Puffer zu	r Durchführung des	ß-Galaktosidaseassays
-----------------------------------	--------------------	-----------------------

## 2.10 Herstellung einer ektopischen *murE*-Kopie und anschließende Deletion des Wildtyp-*murE*

Zur Konstruktion der Stämme O(2x)UR $\Delta$ murE, O(2x)RU $\Delta$ murE, O(2x)UU $\Delta$ murE, O(2x)UU $\Delta$ murE, O(2x)RR $\Delta$ murE mit einer ektopischen Kopie von *murE* wurde das Plasmid pSW1 (Schnorpfeil, 2010) benutzt. pSW1 integriert im Genom von *S. pneumoniae* R6 über die Gene *'bgaA''* und *spr0566'-'spr0568*. Das Plasmid enthält das Gen *tmp*, welches eine Trimethoprim-Resistenz verleiht, was die Selektion der Transformanten erlaubt (s. Abb. 2.3).



Abb. 2.3: Genetische Organisation des Integrationsplasmids pSW1 und dessen Integration in das Genom von *S. pneumoniae.* 

Als blaue Pfeile sind die Gene zur Integration von pSW1 in *S. pneumoniae* mittels homologer Rekombination eingezeichnet. Der obere Bereich zeigt die genetische Organisation von pSW1, der untere die genetische Organisation der Region zwischen *bgaA* und *spr0566 crspr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pSW1. *bla*:  $\beta$ -Laktamase (Ampicillin Resistenz), *tmp*: Trimethoprim-Resistenz, *bga*: endogene  $\beta$ -Galaktosidase, MCS: Multiple Cloning Site.

Da *murE* ein essentielles Gen ist (Thanassi *et al.*, 2002), musste zuerst das Gen an einer anderen Stelle in Genom eingebracht werden und anschließend das ursprüngliche *murE* inaktiviert werden.

Hierzu werden zuerst die Promotorregionen von *murE* aus *S. oralis* Uo5 oder *S. pneumoniae* R6 mit den entsprechenden Primern PM 278/PM 270 und PM 277/PM 270 amplifiziert. Als Template diente DNA aus *S. oralis* Uo5 oder *S. pneumoniae* R6.

Die folgenden Abbildungen zeigen schematisch die verschiedenen Schritte für die Herstellung des Stamms O(2x)RU∆murE. Bei diesem Stamm wurde mit den Primer PM 277/PM 270 und DNA aus *S. oralis* Uo5 ein Fragment amplifiziert, welches das komplette *murE* Gen aus *S. oralis* Uo5 besitzt, aber die Promotorregion von *murE* aus *S. pneumoniae* R6. Nach Verdau der amplifizierten Fragmente und dem Plasmid pSW1 mit *BamHI* und *NheI* wurden die Fragmente ligiert (s. Abb.2.4).



Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Herstellung von pSW1+PR6*murE*Uo5

Die Darstellung zeigt die Strategie zur Herstellung eines pSW1-Derivats, welches *murE* aus *S. oralis* Uo5 besitzt unter der Kontrolle des Promotors von *murE* aus *S. pneumoniae* R6. Durch die Amplifikation von *murE* aus *S. oralis* Uo5 mit den Primern PM 270 und PM 277 (enthält die Sequenz der *murE*- Promotorregion aus *S. pneumoniae* R6) konnte das gewünschte PCR-Fragment geliefert werden. Durch die *BamHI*- und *NheI*-Schnittstellen am Ende des PCR-Fragments konnte dieses nach Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen mit dem zuvor verdauten pSW1 ligiert werden. Das lila Balken in dem PCR-Produkt stellt das *murE*-Gen aus *S. oralis* Uo5 dar, das hellblau die Promotorregion von *murE* aus *S. pneumoniae* R6.

Als Rezipient wurde die Transformante O(2x), mit ausgetauschtem PBP2x, gewählt, da dadurch der β-Laktam-Resistenzanstieg deutlicher zu sehen ist. Selektioniert wurde mit 15 µg/ml Trimethoprim. Abbildung 2.5 zeigt die Strategie zur Herstellung einer ektopischen Kopie von *murE* durch homologe Rekombination von pSW1+PR6*murE*Uo5. Um zu überprüfen, ob die Transformanten das gewünschte Fragment besaßen, wurden PCRs durchgeführt mit den Primer n pPB4\_f und pPB5\_r. Entsprach die Größe des Fragmentes den Erwartungen, wurde dieses sequenziert.



Abb. 2.5: Herstellung einer ektopischen Kopie von murE

Gezeigt ist eine schematische Darstellung zur Herstellung einer ektopischen Kopie von *murE*. Bei der Transformation von pSW1+ PR6*murE*Uo5 (genetische Organisation, oberer Teil) kam es zur Integration des Plasmids im Genom der O(2x)-Transformante (genetische Organisation, mittlerer Teil) über die Gene *'bgaA''* und *spr0566'-'spr0568*. Somit konnte ein Stamm hergestellt werden (unten) mit zwei Kopien von *murE* (lila Pfeile), eine an der ursprünglichen Stelle im Genom, und eine Uo5-Kopie im Bereich *bgaA-spr0566*, welche die Promotorregion von *murE* aus *S. pneumoniae* R6 besaß (hellblauer Pfeil). Weiße Pfeile stellen die flankierenden Gene von *murE* dar bzw. die Gene zur homologen Rekombination. Als roter Pfeil ist der Trimethoprim-Resistenzmarker dargestellt.

Zur Inaktivierung von murE wurde die aad9-Kassette (GenBank Nr. M69221) verwendet.

Die aad9-Kassette ist ein von LeBlanc et al., 1991 aus Enterococcus faecalis isoliertes und charakterisiertes 1158 bp Clal-Ndel-Fragment, auf welchem die Spectinomycin-Adenyltransferase AAD(9) durch das aad9-Gen kodiert ist. AAD(9) katalysiert den Transfer von AMP unter Hydrolyse von ATP auf das Spectinomycin, welches hierdurch inaktiviert wird. Die aad9-Kassette wurde in der vorliegenden Arbeit mit den Primern PM 273 und PM 274 aus dem Stamm S. pneumoniae R6 ciaR::aad9 (Zähner, 1999) amplifiziert und mit BamHI und Nhel verdaut. Ca. 1000 bp lange flankierende up- und downstream Regionen von murE aus S. pneumoniae R6 wurden entsprechend mit den Primern PM 170/PM271 und PM 272/PM 171 amplifiziert, ebenfalls mit BamHI (upstream Region) und NheI (downstream Region) verdaut und mit dem aad9-Fragment ligiert. Abbildung 2.6 zeigt die Strategie zur Herstellung des murE- Inaktivierungsderivats.



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

Die Darstellung zeigt die Strategie zur Herstellung eines *murE*-Inaktivierungsderivats. Zwei PCR-Ansätze lieferten die zur homologen Rekombination im Genom benötigten *murE*-Fragmente, ein dritter das Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* mit Promotor und Terminator. Durch die *BamHI*- und *NheI*-Schnittstellen am Ende der drei Produkte konnten diese nach Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen zu einem Konstrukt ligiert werden, welches das *aad9*-Gen flankiert von den beiden *murE*-Fragmenten umfasste. Gene sind durch Balken dargestellt (lila: *murE*, grün: *aad9*-Resistenzgen, weiß: flankierende Gene von *murE*), schwarze Pfeile deuten Primer an, wobei die Pfeilrichtung die Orientierung der Primer wiedergibt.

Das *murE*-Inaktivierungsderivat wurde in den zuvor erhaltenen Stämmen mit ektopischem *murE* transformiert. Selektioniert wurde auf 80 µg/ml Spectinomycin. Durch homologe Rekombination über die flankierende Bereiche von *murE* konnte die *aad9*-Kassette im Genom integriert werden. Dadurch entstand der Stamm O(2x)RUΔmurE mit einer ektopischen Uo5-*murE*- Kopie unter der Kontrolle des R6-*murE*-Promotors. Abbildung 2.7 zeigt schematisch die Strategie zur Herstellung von O(2x)RUΔmurE. Die Inaktivierung von *murE* wurde mittels PCR mit den Primern PM 170/PM 171 und anschließender Sequenzierung überprüft.

Die Stämme O(2x)UR $\Delta$ murE, O(2x)UU $\Delta$ murE und O(2x)RR $\Delta$ murE wurden mit der gleichen Strategie hergestellt.



Abb. 2.7: Herstellung des Stammes O(2x)RU∆murE

Gezeigt ist eine schematische Darstellung zur Herstellung des Stammes O(2x)RU $\Delta$ murE. Durch die Transformation des durch *aad*9-inaktivierten *murE*-Fragments (oberer Teil) in dem zuvor hergestellten R6-Derivat mit ektopischer *murE*-Kopie (mittlerer Teil) konnte durch homologe Rekombination über die Gene PST und *spr1385-spr1387* der Stamm O(2x)RU $\Delta$ murE hergestellt werden (unten). Dieser besitzt das *murE*-Gen aus *S. oralis* Uo5 (lila Pfeil) unter der Kontrolle des *murE*-Promotors aus *S. pneumoniae* R6 (blauer Pfeil). Durch die Integration der Spectinomycin-Resistenzkassette *aad*9 kam es zur Unterbrechung von *murE* in dem Stamm O(2x)RU $\Delta$ murE. Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet (grün: *aad*9-Resistenzkassette; lila: *murE*; rot: Trimethoprim-Resistenzmarker; weiß: flankierende Bereiche von *murE*).

## 2.11 DNA- Microarray

Die DNA-Microarray-Methode ähnelt im Prinzip den Southern Blots. Der Vorteil der Microarrays besteht aber darin, dass hier die Untersuchung von zwei kompletten Genomen auf unterschiedliche bzw. gemeinsame Gene möglich ist. Dies war in der vorliegenden Arbeit besonders von Interesse nach Transformationsexperimenten, bei denen zu klären war, welche Gene aus dem Donorstamm auf den Rezipienten übertragen wurden.

Beim Microarray sind alle Gene eines Organismus in Form von spezifischen Oligonukleotiden, in rechteckiger, matrixartiger Anordnung auf einem Chip immobilisiert. Diese Oligonukleotide werden mit der zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierter DNA (in Transformante) hybridisiert dem Fall aus der und anschließend durch die Hybridisierungssignale detektiert, quantitativ erfasst und bioinformatisch ausgewertet. Die Fluoreszenzsignale zeigen die Gene an, die nur mit einer oder beiden DNAs hybridisieren.

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Gene in Form von 70meren Oligonukleotiden auf dem Chip vorhanden sind. Somit kann ein Gen, das nur teilweise und außerhalb dieses Bereiches ausgetauscht ist, nicht detektiert werden.

Die Durchführung eines typischen DNA-Microarray-Experiment besteht aus folgenden Schritten, auf die später näher eingegangen wird: die Isolierung und Labeling der DNA, die Herstellung der DNA-Chips, die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten DNA mit den bespotteten Slides, die Detektion der Hybridisierungssignale und die bioinformatische Auswertung der Microarray-Daten (Abb. 2.8)



Abb. 2.8: Verlauf eines DNA-Microarrays

Ein DNA-Microarray besteht aus sechs Schritten: Zuerst wird die DNA der zu vergleichenden Stämme isoliert (1) und markiert (2). Die 70meren Oligos des Referenzstammes werden auf einen speziellen Objektträger aufgebracht (Spotting) (3) und mit den markierten DNAs hybridisiert (4). Nach dem Scannen der Slides (5) folgt die bioinformatische Auswertung (6).

#### 2.11.1 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 umfasst (http://www.nbz.uni-kl.de/de/bio/microarray/ r6tigr4oligos.html).

Der Chip enthält 2038 Oligos, spezifisch für in R6 und TIGR4 annotierte Gene, sowie 328 Oligos für intergene Bereiche (nicht-kodierende Regionen) in R6. Weiterhin enthält das

OligoSet Oligos für 309 TIGR4 spezifischen Gene und 160 intergene Regionen aus TIGR4. Hinzu kommen 44 Oligos für repetitive Elemente, transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA), 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 Oligos handelt es sich um 70meren Sense-Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Amino-C6-Linker besitzen, womit sie eine kovalenten Bindung zu den verwendeten Epoxybeschichteten Nexterion HiSense Slides E (SCHOTT, Jena) eingehen. Die Oligos sind in jeweils 30 µl Spottingpuffer (3 x SSC, 1,5 M Betain) gelöst, so dass sie in einer Endkonzentration von 10 µM vorliegen. Die Platten wurden bei -20°C, versiege It mit Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt.

#### 2.11.2 Labeling genomischer DNA

Zunächst wurde DNA aus den entsprechenden zu untersuchenden *S. pneumoniae* R6-Transformanten und aus dem Wildtyp wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert und mit den beiden Cyanin-Farbstoffen Cy5-dCTP und Cy3-dCTP (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA) gelabelt, welche bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (Cy5: ~670 nm, rot; Cy3: ~570 nm, grün), um später eine spezifische Bindung an die Oligos auf dem Slide nachweisen zu können.

Zur Labeling wurden je 4 µg genomische DNA in einem Volumen von 11 µl eingesetzt (gegebenfalls mit TE-Puffer aufgefüllt) und zur Denaturierung 10 min bei 100℃ im Thermoblock (BIOER, Typ CHB-202) gekocht und anschließend mindestens 10 min auf Eis gestellt. Zu der denaturierten Template-DNA wurden 2 µl 10x dNTP-Mix (1 mM dATPs, dTTPs und dGTPs und 0,5 mM dCTPs), 2,7 µl Random-Primer (3 µg/ml, Invitrogen), 1,3 µl Klenow-Enzym (Large Fragment of DNA Polymerase I, 9 U/µl, Invitrogen), 2 µl 10x Klenow-Enzym Reaktionspuffer (10x REact<sub>®</sub>2, Invitrogen) und 1 µl Cy3- oder Cy5-dCTPs (1 mM) hinzugegeben. Da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, fand das Arbeiten unter geringem Lichteinfluss statt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C im Dunkeln inkubiert und am darauf folgenden Tag einer Ethanol-Präzipitation unterzogen, um den restlichen Puffer, Enzym und freien Farbstoff von der markierten DNA zu entfernen. Dazu wurde die Reaktion zunächst durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 und 3 µl 3 M Natriumacetat pH 5,0 abgestoppt. Danach wurde durch Zugabe von 1 ml 100 % eiskaltem Ethanol für 30 min bei -20 $^{\circ}$  die DNA gefällt. Ansch ließend wurde bei 20.000 rpm und 4 $^{\circ}$ , 25 min in der Kühlzentrifuge (Heraeus Sepatech Biofuge 28RS, Rotor HFA 28.1) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen der DNA wurde 1 ml 70 %-iges Ethanol zugefügt und 20 min bei 4°C inkubiert. Dana ch wurde der Ansatz für 10 min bei 13.000 rpm und 4℃ in der Kühlzentrifuge zentrifugi ert. Der Überstand wurde erneut
verworfen, das Pellet in der SpeedVac (Univapo 100H) getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.11.3 Spotten der Slides

Das Spotten der Slides wurde mit dem SpotArray<sup>™</sup>24 Microarray Spotting System BioChip Technologies (Packard BioScience) und der dazugehörigen Software SpotArray<sup>™</sup> (PerkinElmer) mit 32 SMP3-Pins (Telechem) durchgeführt. Dieser Spotter arbeitet nach der Technologie des Kontakt-Spottings, bei dem die Oligos mit speziellen Dispensiernadeln (Pins) aus den Mikrotiterplatten aufgenommen und anschließend durch mechanischen Kontakt mit der Trägeroberfläche aufgetragen werden. Vor dem Spotten wurde ein \*.gal-File erstellt, der die Information der genauen Position der Oligos auf dem Slide liefert, so dass nach dem Printvorgang jeder Spot einem Oligonukleotid zugeordnet werden konnte.

Die in dieser Arbeit benutzten Slides beinhalten 70meren Oligonukleotide aus dem Genom von *S. pneumoniae* R6 und TIGR4, welche von der Firma Operon (Huntsville, USA) synthetisiert wurden. Diese wurden in 384-well Platten geliefert und in 30 µl Spotting Puffer (3 x SSC, 1,5 M Betain) gelöst, so dass die Endkonzentration der Oligos 10 pmol/µl betrug.

Jedes Oligonukleotid wurde zur Fehlerverminderung jeweils zweimal nebeneinander gespottet. Das Spotten fand unter einer relativen Luftfeuchte von 50-70 % statt.

Die Slides wurden zunächst mit einem Diamantschreiber beschriftet, mit einer Druckluftvorrichtung von Staubpartikeln befreit und in die Spottingkammer eingelegt. Als Blocking-Slides, auf denen ein Abtupfen der Pins erfolgte, fungierten gewöhnliche Objektträger, die vor dem Einlegen mit Ethanol (70 %, tech.) gesäubert wurden.

Die Mikrotiterplatten mit den Oligonukleotiden wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, für 2 min bei 800 rpm abzentrifugiert (Hermle Z 513 K, Axon) und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Folgende Parameter wurden mittels der SpotArraySoftware eingestellt (Tab. 2.39).

Nach dem Spotten wurden die Slides für 30 min in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 60 min bei 85°C gebacken. Diese beiden Schritte bewirkten 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.

Die DNA-Chips wurden bis zur Verwendung trocken und dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Auf den derart hergestellten DNA-Chips befanden sich alle Oligos und Pufferkontrollen in jeweils 2-facher Ausführung in der zuvor in der SpotArray<sup>™</sup>-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.

Parameter	R6/TIGR4 Chipset
Number of plates per plate change	3
Read barcodes on plates	no
Read barcodes on substrates	no
Number of pre-prints after each sample load	10
Pre-print spot spacing, center to center [µm]	500
Number of times to print each spot within array	2
Nominal spot diameter [µm]	150
Spot spacing, center to center [µm]	345
Location on array on substrate	center
Leave space for a barcode/label on bottom	yes
Printing approach velocity [mm/s]	10
Printing departure velocity [mm/s]	10
Printing overtravel [µm]	0
Printing dwell time [ms]	400
Sample load overtravel [µm]	100
Sample load dwell time [ms]	2500
Substrate thickness [mm]	1,1
Maximum number of spots per sample load	120
Speed of printhead X-Y motion	fast
Lenght of wash procedure [s]	6
Number of times to wash	4
Lenght of dry procedure after washing [s]	3
Do not print when humidity is outside of acceptable range	yes
Minimum acceptable humidity [% RH] <sup>1</sup>	50
Maximum acceptable humidity [% RH] <sup>1</sup>	70
Control humidity level during printing procedure	yes
Target humidity level [% RH] <sup>1</sup>	65
Do not print when temperature is outside of acceptable range	yes

#### Tab. 2.39: Spotting Protokoll der ScanArraySoftware

<sup>1</sup>) RH=relative humidity

## 2.11.4 Hybridisieren

Bei der Hybridisierung bindet die markierte DNA unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken homologe Basen der auf den Slides immobilisierten Oligonukleotide. Aufgrund der unterschiedlichen Markierung der DNA (R6: Cy3; Transformante: Cy5) lässt sich später erkennen, welche DNA gebunden hat.

Den markierten DNAs wurden zuerst je 55 µl auf 95°C erwärmter Hybridisierungspuffer (Nexterion Hyb, 1:1 mit Formamid gemischt) zugefügt, die Ansätze 5 min zur Denaturierung auf 96°C erhitzt und danach kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden Transformanten-(Cy5-gelabelt) und Wildtyp-DNA (Cy3-gelabelt) gemischt und erneut 5 min bei 96°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte maschinell mit Hilfe einer Hybridisierstation (Tecan HS400). Die Injektion der Proben auf die gespotteten Slides erfolgte nach Prähybridisierung der Slides im Rahmen des in Tabelle 2.40 aufgeführten Protokolls. Die eigentliche Hybridisierung dauerte ca. 16 h. Nach Hybridisierung, Waschen und Trocknen 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. 2.41 zu entnehmen.

Schritt	Komponente	Wasch-	Einwirk-	Temperatur	Zyklen
		dauer	dauer		
1 Waschen	SDS (0,1 %)	30 s	30 s	25°C	1
2 Waschen	H <sub>2</sub> O	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 (0,1x)	1 min	30 s	30°C	1
10 Trocknen der		2 min		2000	
Objektträger		2 11111		30 0	

Tab. 2.40:	Einstellungen	des verwendeten	Hybridisierung	gsprotokolls
------------	---------------	-----------------	----------------	--------------

Tab. 2.41: Lösungen und Puffer für d	lie Microarray-Hybridisierung
--------------------------------------	-------------------------------

Lösung	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	

## 2.11.5 Scannen der hybridisierten Slides

Die hybridisierten Slides wurden mit Hilfe des Laserscanners (ScanArray® GX Microarray, PerkinElmer Life Sciences, USA) eingescannt. Dabei wurde ein hybridisierter Chip

nacheinander von zwei Lasern verschiedener Wellenlänge gescannt. Der Farbstoff Cy5 wurde mit Licht der Wellenlänge  $\lambda$  = 633 nm angeregt und die Emission bei 670 nm gemessen. Cy3 wurde entsprechend bei 543 nm angeregt und bei 570 nm gemessen. Von jedem Kanal, welcher jeweils einem Fluorophor (Cy3 oder Cy5) entspricht, wurde ein 16-bit TIFF-Bild erzeugt. Zur Visualisierung und Auswertung der Hybridisierungsergebnisse wurden die beiden Bilder übereinander gelegt. Für Cy5-Signale wurde rot, für Cy3-Signale grün verwendet. Die Steuerung des Scannes erfolgte durch die ScanArray Express Software. Unter Verwendung der EasyScanOption wurden die Slides zunächst mit einer niedrigen Auflösung von 50  $\mu$ M gescannt, wobei die Photomultiplier TubeStärke (PMT) in der Form justiert wurde, dass beide Fluoreszenzkanäle in etwa die gleichen Signalintensitäten lieferten. Unter Verwendung der so ermittelten PMT-Werte wurden die hybridisierten Slides im Anschluss mit einer Auflösung von 10  $\mu$ m gescannt.

## 2.11.6 Auswertung der Microarray-Daten

Die Auswertung der Mikroarray-Daten erfolgte mit der Software ScanArray® Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA), Microsoft® Excel 2003 (1985-2003) und diversen Anwendungen, die auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern zur Verfügung stehen. Zunächst wurden die beiden \*.tiff-Dateien der Fluoreszenzkanäle geöffnet und das durch Überlagerung dieser Dateien von der Software erzeugte "Composite"-Bild, wenn nötig, mit Filtern (3x3 Median, Black threshold) optimiert. Die Quantifizierung der gemessenen Cy3- und Cy5-Intensitäten erfolgte durch die "Adaptive circle" Option der Software, die Normalisierungsmethode war "Locally Weighted Scatter Plot Smoothing (LOWESS)" (Yang *et al.*, 2001) und der Zuordnungsmethode "Auto find Spots".

Dabei wurden die eingescannten \*.tiff-Dateien der hybridisierten Slides und die zuvor erstellten \*.gal-Datei, welche die genaue Position der Oligos auf dem Slide lieferte, mit Hilfe der Software aufeinander abgestimmt, so dass jedem Spot ein Gen zugeordnet werden konnte. Nach Zuordnung der Spots wurden diese manuell überprüft und gegebenenfalls nachkorrigiert. Das Ergebnis der Quantifizierung wurde als \*.csv- 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 Kontrollspots wurden diese ebenfalls entfernt und die so modifizierte Ergebnisdatei unter Verwendung der auf der Internetseite des Nano & BioCenter der TU Kaiserslautern (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) bereitgestellten Anwendungen ausgewertet. 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. Schließlich wurden die Intensitätswerte und die Ratios (Verhältnisse von Intensitätsdaten) der normalisierten Daten in ein Excel-Tabellenblatt kopiert, so dass die entsprechenden Werte (Intensitäten oder Ratios) der unterschiedlichen Hybridisierungen nebeneinander angeordnet wurden. Anschließend wurden die 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. Gene, die nicht als "signifikant" detektiert wurden, also in beiden Stämmen die gleiche Sequenz besitzen, hatten einen Ratio-Mittelwert (AVG) von etwa 1. "Signifikante" Gene wiesen eine Ratio kleiner als 0,5 bzw. größer als 2 auf.

## 2.12 Präparation und Analyse von Pneumokokken-Zellwand

Um mögliche Auswirkungen von *S. oralis* Uo5 *murE* auf die Zellwandbiosynthese und struktur festzustellen wurde die Zellwand ausgewählter R6-Transformanten und des Donorstammes *S. oralis* Uo5 präpariert und analysiert. Die Methoden für die Isolierung der Zellwand und des Mureins aus Pneumokokken, sowie für die anschließende quantitative Analyse mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wurden von A. Tomasz und Mitarbeitern entwickelt (García-Bustos *et al.*, 1988; Severin *et al.*, 1996; Severin und Tomasz, 1996).

Durch Kochen der Bakterienzellen in SDS wird die Zellmembran und ein großer Teil der Proteine in Lösung gebracht. Die unlösliche Zellwand wird durch Zentrifugation gewonnen und anschließend von SDS befreit durch wiederholte Zentrifugations- und Resuspensions-Schritte. Nachdem die Zellwand mit Hilfe von Glasperlen mechanisch aufgeschlossenen wurde, wurden RNA, DNA und gebundene Proteine durch RNase-, DNase- und Protease-Verdau entfernt. Die Zellwand wird gewonnen nach weiteren Reinigungsschritten mit heißem SDS, LiCl, EDTA und Aceton. Um das Murein in seiner Struktur in der HPLC untersuchen zu können, musste das Peptidoglykan-Makromolekül in kleinere Bestandteile zerlegt werden. Die Zusammensetzung einer erhaltenen Zellwand kann auf zwei Arten analysiert werden:

- 1) Durch Verdau mit dem Pneumokokken-Hauptautolysin N-Acetylmuramyl-L-alaninamidase LytA werden die Stammpeptide freigesetzt, wodurch der Vernetzungsgrad und der Anteil an verzweigten Peptiden in der Zellwand bestimmt werden kann.
- 2) Durch Muramidasen wie Cellosyl wird das Murein in niedermolekulare Muropeptide (Disaccharid-Peptid-Untereinheiten) gespalten. Dabei wird die glykosidische Bindung zwischen MurNAc und GlcNAc gelöst und Muropeptide mit reduzierenden MurNAc-Enden freigesetzt. Cellosyl erhält den Vorzug gegenüber Lysozym, da Lysozym die Zuckerketten teilweise nur bis zu den Tetrasacchariden abbaut und als Nebenreaktion zyklische Muropeptide bildet. Zusätzlich können durch die Hydrolyse

von Phosphomono- und diester-Bindungen von der Wandteichonsäure (WTA) mit Hydrofluorsäure (Fluorwasserstoffsäure) Muropeptide ohne WTAs isoliert und analysiert werden (Vollmer, 2007a).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die zweite Methode eingesetzt. Nach dem Verdau mit Cellosyl liegen die Muropeptide mit den reduzierten Zuckern in zwei anormen Formen vor, welche bei der HPLC-Analyse mit unterschiedliche Retentionszeiten eluieren und somit zu einem komplizierten Peakmuster führen. Aus diesem Grund werden die freigesetzten Muropeptide 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  $\mu$ m) (Bischoff Chromatography, Leonberg) bei einer Temperatur von 55°C und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Säule wurde für 60 min mit Natriumphosphat (10 mM) und Methanol (10 %), versetzt mit Natriumazid (10  $\mu$ l/l), equilibriert. Die Proben (20-100  $\mu$ l) wurden injiziert und die Trennung erfolgte 135 min in einem linearen Gradienten von Equilibrierungspuffer bis 10 mM Natriumphosphat, 30 % Methanol.

Die Detektion der eluierten Muropeptide erfolgte über die Messung der UV-Absorption der Peptidbindung bei 205 nm. Durch Vergleich des Peakmusters der erhaltenen Signale mit denen aus Chromatogrammen von Stämmen mit bekannter Muropeptid-Zusammensetzung und bereits identifizierten Muropeptiden (*S. pneumoniae* R6) konnten den Signalen Strukturen zugeordnet werden. Für die Signale unbekannter Substanzen aus zuvor nicht untersuchen Stämmen (z.B. *S. oralis* Uo5) wurden die Peaks gesammelt, in einer SpeedVac getrocknet und mittels eines Massenspektrometers deren Aminosäure-/Aminosäure-Zucker-Zusammensetzung und Molekulargewichte bestimmt.

## 2.12.1 Herstellung der Zelllysate zur Isolierung der Zellwand

Zur Herstellung der Zelllysate für die Zellwandpräparation wurde 1 I auf 37°C vorgewärmtes C-Medium mit 50 ml einer S. *pneumoniae*-Vorkultur beimpft und bei 37°C wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wurde die Kultur in einem Eiswasserbad für 10 min abgekühlt und anschließend für 10 min bei 7.000 rpm und 4°C im JA-10 Rotor (Beckman-Zentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml eiskaltem Tris-HCI-Puffer (1 M, pH 7) resuspendiert und die Suspension tropfenweise unter ständigem Rühren in 120 ml kochende SDS-Lösung (5 %) zugefügt. Nachdem die komplette Bakteriensuspension dem kochenden SDS zugefügt wurde, wurde der gesamte Ansatz weitere 15 min gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Überführung in Plastikröhrchen wurden die Proben bei Raumtemperatur zur Analyse verschickt.

## 2.12.2 Isolierung der Zellwand und Muropeptide

Die Isolierung und anschließende HPLC-Analyse der Muropeptide, sowie die Auswertung der Daten wurde in 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.

Das in SDS unlösliche Murein wurde durch mehrfache Ultrazentrifugation (UZ) von SDS frei gewaschen, um die nachfolgende Enzymreaktion durchführen zu können.

Um die Suspension SDS frei zu bekommen, wurde das Pellet nach der UZ (Beckman-Coulter Optima TLX: Rotor TLA 100.3, 90.000 rpm, 20 min, RT) mit warmen Wasser und einem Glasstab vorsichtig resuspendiert. Diese Prozedur wurde solange durchgeführt bis im Überstand kein SDS nach dem SDS-Schnelltest nach Hayashi (Hayashi, 1975) mehr nachzuweisen war.

Dazu wurden 335 µl des Überstandes mit 170 µl 0,7 M Natriumphosphat, pH 7,2, 7 µl 0,5 % Methylenblau und 1 ml Chlorophorm in einem Glasröhrchen gemischt und 30 s gevortext. Die (untere) Chlorophorm Phase färbt sich in Anwesenheit von SDS blau, wenn das Lysat SDS-frei ist, erscheint die Phase durchsichtig bis leicht rosa.

Nachdem die Suspension von SDS befreit wurde, wurde das Pellet in 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, und in je 3 Microtubes (2 ml, Sarstedt), die zuvor zu 1/3 mit Glasbeads (Sigma, Durchmesser 0,17-0,18 mm) gefüllt waren, aufgeteilt. Im Kühlraum erfolgte durch Fast Prep FP 120 der Zellaufschluss mit 8 Pulsen (20 s, maximaler Geschwindigkeit). Nach jedem zweiten Puls wurden die Tubes zum Abkühlen 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen durch das Filtrieren mit einem Glasfilter von den Glasbeads getrennt. Das Filtrat wurde in einem sterilen Kolben aufgefangen. Um möglichst alle Glasbeads aus den Tubes zu erhalten, wurde jedes Tube mit 500 µl Tris-HCl, pH 7 gespült und diese Waschlösung auf den Glasfilter gegeben. Zum Schluss erfolgte ein Spülen des Filters mit 2,5 ml Tris-HCI, pH7. Die gefilterte Suspension wurde in Plastikröhrchen umgefüllt und 5 min bei 2.000 x g und RT zentrifugiert. Dabei konnten nicht aufgeschlossene Zellen im Pellet von den aufgeschlossenen im Überstand getrennt werden. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 min, 20.000 x g, RT) des Überstandes wurden die sedimentierten, aufgebrochenen Zellwände in 5 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> gelöst. Anschließend wurden die Zellwände 2 h bei 37°C unter Rühren mit DNase (10 µg/ml) und RNase (50 µg/ml) verdaut. Nach Zugabe von 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 µg/ml Trypsin wurden die Zellwandsuspensionen weitere 18 h bei 37°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Enzyme wurde am folgenden Tag SDS-Lösung (Endkonz. 1 %) zugegeben und 15 min bei 80°C inkubiert. Nach Auffüllen der Röhrchen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und einen Waschschritt bei 25.000 x g, 30 min und RT wurden die Pellets mit 10 ml LiCl (8 M), resuspendiert und 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Suspensionen wie vorher beschrieben zentrifugiert wurden, wurden die Pellets mit 10 ml 100 mM EDTA, pH 7 resuspendiert und wieder 15 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Suspensionen erneut zentrifugiert wurden, wurden die Pellets zweimal mit ca. 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, dann mit 40 ml Aceton und schließlich noch zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Die Pellets wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen, in Glasgefäß überführt und für 2-3 h bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellwände über Nacht lyophilisiert.

Die isolierten Zellwände wurden in 3 ml eiskalter Fluorwasserstoffsäure (48 %) in einem Polyallomer Tube resuspendiert. Das Tube wurde mit Parafilm verschlossen und die Probe rührend für 48 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min (70.000 rpm, 4°C) in der Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter Optima TLX: Rotor TLA 100.3) zentrifugiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Wasser, einmal mit 3 ml eiskaltem 100 mM Tris-HCl, pH 7 und 2 weitere Male mit 3 ml eiskaltem Wasser gewaschen.

Das Pellet, welches nach dem letzten Waschschritt gewonnen wurde, wurde in 500 µl Wasser resuspendiert. Natriumazid wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % hinzugegeben und das gewonnene Murein bei 4°C gelagert. Anschließend wurde ein Cellosyl-Verdau durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 100 µl Mureinsuspension mit 40 µl 80 mM Natriumphosphat, pH 4,8 und 20 µl Cellosyl (0,5 mg/ml) versetzt und rührend 18 h bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch 10 minütiges Kochen bei 100°C gestoppt. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 5 min, RT) wurde das denaturierte Enzym (im Pellet) von den Muropeptiden (Im Überstand) getrennt. Die Muropeptide wurden bis zur weiteren Anwendung bei -20°C gelagert.

Um unterschiedliche Retentionszeiten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren der Muropeptide, die durch Mutarotation am C1 der MurNAc entstehen, zu vermeiden, wird die Muraminsäure zum Muraminitol reduziert. Zunächst wurde der pH des Ansatzes auf pH 9.0 eingestellt. Nach Einstellung des pH's wurde eine Spatelspitze Natriumborhydrid hinzugeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Reduktionsreaktion wurde durch pH-Einstellung auf pH 3-4 mit 20 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt. Die reduzierten Muropeptide wurden bei -20°C gelagert.

## 2.12.3 Analytische Trennung der Muropeptide in der HPLC

Die reduzierte Muropeptidlösung wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand mit den Muropeptiden in HPLC-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit 280 µl Probe befüllt und zur Analyse in die HPLC (Agilent 1100 system, Software: ChemStation) gestellt. Die

Säule wurde für 60 min mit Natriumphosphat (10 mM) und Methanol (10 %), versetzt mit Natriumazid (10 µl/l), equilibriert.

Die Auftrennung erfolgte nach dem Reversed-Phase-HPLC-System von Glauner (1988) in einer Prontosil Säule, die auf 55°C temperiert war. Die Detektion erfolgte bei 205 nm mit einem UV/Vis Detektor.

Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten in 135 min von 100 % Puffer A (10 mM Natriumphosphat pH 6) nach 100 % Puffer B (10 mM Natriumphosphat pH 6 + 30 % Methanol) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Im Falle von *S. oralis* Uo5 wurden die einzelnen Muropeptidfraktionen (die einzelnen Peaks im Chromatogramm) in kleinen Gläsern gesammelt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

## 2.12.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Muropeptide von S. oralis Uo5

Die massenspektrometrische Untersuchung der gesammelten Muropeptidfraktionen von *S. oralis* Uo5 wurde freundlicherweise von Dr. Joy Gray vom Pinnacle Laboratory am Institute for Cell and Molecular Biosciences, Medical School der University of Newcastle upon Tyne (UK) übernommen.

## 2.13 Bezugsquellen

## Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Darmstadt; Fluka Analytical AG, Neu Ulm; Merck AG, Darmstadt; C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva GmbH & Co., Heidelberg; Sigma-Aldrich GmbH, Deideshofen.

## Enzyme

Die eingesetzten Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen: Eurogentec, Köln; Roche, Basel; New England Biolabs (NEB), Schwalbach; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot; Stratagene, Heidelberg.

## Antibiotika

Die eingesetzten Antibiotika stammten von den folgenden Firmen: Applichem, Darmstadt; C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva GmbH & Co., Heidelberg; Sigma-Aldrich GmbH, Deideshofen.

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

## 2.14 Computergestützte Datenverarbeitung, -analyse und -abfrage

## 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-Oligonukelotid-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
- **Graph** (Version 4.3, Unterversion 384, 2007) Erstellung und Normalisierung von Wachstumskurven
- Microcal<sup>™</sup> Origin<sup>®</sup> (Version 6.0, 1991-1999)
   Erstellung von Wachstumskurven und Diagrammen
- Microsoft® Office Standard Edition 2003 (1985-2003) diverse Verwendung
- ScanArray® Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer) Auswertung von Microarray-Daten

## Datenbanken

- <u>http://bioinfo.genotoul.fr/multalin.html</u>
   Alignments von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen
- <u>http://nbc3.biologie.uni-kl.de/</u> Auswertung, bioinformatische Aufarbeitung und Darstellung von Microarray-Daten, BLAST-Analysen
- <u>http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/cgi-bin/home.cgi</u>
   Faltung von Nukleotid-Sequenzen (RNA-Strukturvorhersage)
- <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>
   Literaturrecherche, Abruf von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen, BLAST-Analysen

## 3 Ergebnisse

Niedrigaffine PBPs mit Mosaikstrukturen sind das Resultat von Gentransfer- und Rekombinationsereignissen zwischen *S. pneumoniae* und kommensalen Streptokokken-Arten (Chalkley und Koornhof, 1990, Chalkley *et al.*, 1991, Potgieter und Chalkley, 1991). Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Mosaikgenen aus resistenten *S. pneumoniae*-Stämmen wurden in *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguis* identifiziert (Coffey *et al.*, 1993, Dowson *et al.*, 1990, Dowson *et al.*, 1993, Potgieter und Chalkley, 1995, Sibold *et al.*, 1994). Es sind nur sehr wenige Nicht-PBP-Gene bekannt, die auch an der  $\beta$ -Laktam-Resistenzentwicklung beteiligt sind.

Transformationen mit chromosomaler DNA aus dem hochresistenten *S. mitis* B6 in *S. pneumoniae* R6 haben gezeigt, dass die  $\beta$ -Laktam-Resistenz des Rezipienten durch die Übertragung von niederaffinen PBPs (*pbp2x*, *pbp1a*, *pbp1b*, *pbp2a* und *pbp2b*) deutlich ansteigt (Hakenbeck *et al.*, 1998). *S. mitis* ist phylogenetisch sehr nah mit *S. pneumoniae* verwandt, anders als *S. oralis*, der sich genetisch deutlich von *S. pneumoniae* und *S. mitis* abgrenzen lässt (Chi *et al.*, 2007). Ausgehend von dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der resistente *S. oralis* Uo5 ebenfalls als Donor für die Entwicklung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz in Pneumokokken fungiert. In einer zuvor publizierten Arbeit wurde die Übertragung des niederaffinen *pbp2x* aus *S. oralis* Uo5 in *S. pneumoniae* R6 beschrieben (Reichmann *et al.*, 1997). Eine Übertragung von weiteren PBPs war dabei nicht beschrieben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Transfer von niederaffinen PBPs aus *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6 durch sukzessive DNA-Transformation. Darüber hinaus war von Interesse, ob und wenn ja, welche Nicht-PBP-Gene bei der  $\beta$ -Laktam-Resistenzentwicklung eine Rolle spielen.

## 3.1 Charakterisierung von S. oralis Uo5

Der Erwerb von PBP-vermittelter  $\beta$ -Laktam-Resistenz kann nicht nur von Vorteil sein, sondern trägt vermutlich physiologische Konsequenzen für die Zelle mit sich, wie verlangsamtes Wachstum und veränderte Morphologie (Mascher *et al.*, 2006; Zerfass, 2010). Zunächst wurden Resistenzprofil für  $\beta$ -Laktame sowie Wachstum und Morphologie des Donorstammes *S. oralis* Uo5 charakterisiert und mit dem Rezipienten vergleichen, dem Laborstamm *S. pneumoniae* R6.

## 3.1.1 β-Laktam-Resistenz von S. oralis Uo5

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Donorstammes *S. oralis* Uo5 ist von Bedeutung für die Identifizierung von potentiellen Resistenzdeterminanten und die Überprüfung von deren Resistenzpotential. Es wurde die MHK der β-Laktame Piperacillin,

Oxacillin, Cefotaxim und Penicillin G getestet. Penicillin G ist ein natürliches,  $\beta$ -Laktamasesensitives Penicillin, das unwirksam gegen Gram-negative Keime ist. Bei Oxacillin und Piperacillin handelt es sich um halbsynthetische Penicillin-Derivate. Oxacillin ist  $\beta$ -Laktamase-resistent und im Vergleich zu den anderen Penicillinen zeigen seine MHK deutlich höhere Werte, was eine bessere Differenzierung zwischen Sensitivität und Resistenz erlaubt. Bei Piperacillin handelt es sich um ein Breitbandpenicillin, welches gute Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zeigt. Cefotaxim gehört zu den Cephalosporinen der dritten Generation, die ein breites Wirkungsspektrum und  $\beta$ -Laktamase-Resistenz aufweisen. Die hochlytischen  $\beta$ -Laktame Penicillin G, Piperacillin und Oxacillin binden mit hoher Affinität die für diese Arbeit relevanten PBP1a, 2x und 2b. Im Gegensatz dazu binden Cephalosporine der dritten Generation wie Cefotaxim nicht an PBP2b, und eine hohe Cefotaxim-Resistenz weist auf ein verändertes PBP1a hin.

Streptokokken-Stämme werden nach den Vorgaben des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) als sensitiv, intermediär-resistent, resistent bzw. hochresistent eingestuft. Die Einteilung der Stämme nach ihrer MHK ist in Tab. 3.1 angegeben und bezieht sich auf das Antibiotikum Penicillin.

Tab. 3.1: Einteilung der	Penicillin-Resistenz
--------------------------	----------------------

MHK-Wert [µg/ml]	Einteilung
≤ 0,06	Sensitiv
> 0,06-1	Intermediär-resistent
> 1- 2	Resistent
> 2	Hochresistent

Diese Einteilung wurde vom National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aufgestellt und gilt für Penicillin.

Die Bestimmung der Resistenz vom Donorstamm *S. oralis* Uo5 erfolgte mit dem E-Test. Die publizierten MHK-Werte von *S. oralis* Uo5 betragen 8-12 µg/ml Cefotaxim, 32 µg/ml Penicillin G und 96 µg/ml Oxacillin (Reichmann *et al.*, 1997). Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für Oxacillin liegt deutlich höher, der für Penicillin G und Cefotaxim im selben Bereich wie die publizierten Daten (s. Tab. 3.2). Der MHK-Wert für Penicillin von *S. oralis* Uo5 erlaubt die Einstufung des Stammes als hochresistent.

β-Laktam	MHK [µg/ml]
Cefotaxim	10
Piperacillin	96
Penicillin G	>32
Oxacillin	>256

Tab.	3.2:	MHK-	Werte	für	S.	oralis	Uo5
1 0 0 1	· · · ·				Ο.	orano	000

## 3.1.2 Morphologie der Streptokokken-Stämme

In Flüssigkultur zeigt *S. pneumoniae* R6 ein Wachstum in kurzen Ketten oder als Diplokokken, während *S. oralis* Uo5 deutlich längere Ketten aufweist (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Mikroskopische Aufnahme von *S. pneumoniae* R6 (A) und *S. oralis* Uo5 (B)

Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Ölimmersion) aufgenommen.

## 3.1.3 Wachstumsverhalten von S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Um zu überprüfen, ob der hochresistente *S. oralis* Uo5 im Vergleich zum sensitiven R6-Stamm Auffälligkeiten im Wachstumsverhalten zeigt, wurden Wachstumskurven erstellt (Abb. 3.2).



Abb. 3.2: Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 Dargestellt sind die Wachstumskurven der Stämme *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5. Die in C-Medium exponentiell wachsenden Kulturen wurden 1:20 in vorgewärmtes C-Medium überimpft und das Wachstums mit Hilfe eines Nephelometers alle 30 min verfolgt.

Beide Stämme zeigen in Flüssigmedium ein leicht unterschiedliches Wachstumsverhalten. Der Stamm *S. oralis* Uo5 hat eine Generationszeit von ca. 35 min, während *S. pneumoniae* R6 sich etwa alle 29 min teilt. Nach ca. 4,5 Stunden stationärer Phase fängt bei R6 die Zelllyse an, wohingegen Uo5 für mindestens 24 Stunden eine stabile OD in der stationären Phase aufweist.

## 3.2 Transfer von pbp2x aus S. oralis Uo5 in S. pneumoniae R6

PBP2x und PBP2b sind primäre Targets der  $\beta$ -Laktame und werden somit als erstes verändert (Grebe und Hakenbeck, 1996). Modifikationen in diesen zwei Genen führen zu einer relativ geringen Resistenzerhöhung, sind aber Voraussetzung für hohe  $\beta$ -Laktam-Resistenz, die durch zusätzliche Veränderungen in weiteren PBPs erreicht wird (Barcus *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1992). Die Selektion von mehreren niederaffinen PBPs erfordert somit das Vorhandensein eines modifizierten PBP2x oder PBP2b. Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Transformationen wurden zur Selektion aus folgenden Gründen verschiedene  $\beta$ -Laktame verwendet: Cefotaxim bindet nicht an PBP2b (Hakenbeck *et al.*, 1987), d.h. es ist für die Selektion von niederaffinen PBP1a geeignet (Laible und Hakenbeck, 1987; Muñoz *et al.*, 1992;

Reichmann, 1997). Mit Penicillinen wie Piperacillin und Oxacillin können Mutationen in PBP2x ebenfalls selektioniert werden, aber auch solche in PBP2b (Hakenbeck *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1998; Reichmann *et al.*, 1996; Zerfass, 2010). Dabei selektioniert Piperacillin vorzugsweise Mutationen in PBP2b (Grebe und Hakenbeck, 1996), während Oxacillin die Resistenzunterschiede in der MHK am deutlichsten darstellt. Die Wahl der Selektionskonzentrationen richtete sich nach der MHK des Rezipienten für das jeweilige Antibiotikum. Sie sollte nicht zu hoch angesetzt werden, um die Selektion von zusätzlichen Mutationen zu vermeiden und genügend Transformanten zu erhalten, aber auch nicht so niedrig, dass auf der Kontrollplatte ohne DNA zu viele Kolonien zu beobachten sind. Werden nach der Transformation nur wenige Kolonien auf der Selektionsplatte beobachtet, ist das generell ein Zeichen dafür, dass entweder die Konzentration zu hoch gewählt war oder dass sich diese Resistenzstufe nicht transformieren lässt.

Die Benennung der erhaltenen Transformanten in dieser Arbeit erfolgte nach den Selektionsantibiotika in der Reihenfolge, wie sie verwendet wurden. So ist z.B. der Stamm PCP eine Transformante, entstanden durch drei Transformationen mit den Selektionsantibiotika Piperacillin (P, erste Transformation), Cefotaxim (C, zweite Transformation) und in der dritten Transformation noch einmal Piperacillin. Transformationen mit amplifizierten Fragmenten wurden durch Klammern angezeigt, wobei das in Klammern stehende Gen dem Amplifikat entspricht. So z.B. ist der Stamm O(2x) durch Transformation mit amplifiziertem *pbp2x* unter Oxacillinselektion (O) entstanden.

In der ersten Transformationsstufe wurde einerseits das β-Laktam Oxacillin für die Selektion von PBP2x und andererseits Piperacillin zur Selektion von PBP2b gewählt.

## 3.2.1 Transformation von S. pneumoniae R6 unter Oxacillinselektion

Niederaffine Varianten von PBP2x aus *S. oralis* Uo5 konnten bereits durch die Selektion mit Cefotaxim erhalten werden (Becker, 2008; Reichmann *et al.*, 1997). Da durch Oxacillin ebenfalls Veränderungen in PBP2x selektioniert werden können (Zerfass, 2010), wurde zunächst eine Transformation mit chromosomaler *S. oralis* DNA und Oxacillin als Selektionsantibiotikum durchgeführt. Als Rezipient diente der sensitive *S. pneumoniae* R6 (MHK= 0,07  $\mu$ g/ml Oxacillin). Die gewählten Selektionskonzentrationen waren 0,1 und 0,2  $\mu$ g/ml Oxacillin. Da bei hohen  $\beta$ -Laktam-Konzentrationen die Gefahr besteht, zusätzliche Mutationen zu selektionieren, wurden Klone von möglichst niedrigen Konzentrationen zur weiteren Analyse ausgesucht.

Oxacillin	Transformanten	Lebendkeimzahl	Transformations-	Negativkontrolle
[µg/ml]	[cfu/ml]	[cfu/ml]	effizienz [%]	[cfu/ml]
0,1	4,83x10 <sup>3</sup>	5,6x10 <sup>7</sup>	0,9x10 <sup>-2</sup>	4x10
0,2	2,21x10 <sup>3</sup>	5,6x10 <sup>7</sup>	0,4x10 <sup>-2</sup>	0

#### Tab. 3.3: Selektion der O-Transformanten

Aufgeführt sind die erhaltenen Ergebnisse bei der Transformation von S. pneumoniae R6 mit chromosomaler Uo5-DNA unter Selektion von Oxacillin. 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 Transformationseffizienz ist definiert als der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl.

cfu: colony forming units

Zur weiteren Untersuchung wurden 10 Transformanten O1-10 von der 0,1 µg/ml-Selektionsplatte gepickt, da die Anzahl der erhaltenen Kolonien deutlich über der der Negativkontrolle lag und signifikant weniger Transformanten bei höheren der Selektionskonzentration auftraten.

Um zu überprüfen, ob in den erhaltenen Transformanten ein PBP aus dem Donorstamm S. oralis Uo5 übertragen wurde, wurden die PBP-Profile der Transformanten analysiert. Die Lysate wurden mit Bocillin<sup>TM</sup>FL, einem fluoreszierenden Derivat von Penicillin V, inkubiert, Im Falle eines niederaffinen PBPs kann Bocillin nicht oder nur schwach an das PBP binden. Um zu beurteilen welche PBPs bei den Transformanten ausgetauscht wurden, wurde das Lysat von S. pneumoniae R6 als Kontrolle aufgetragen (Abb. 3.3).





Je 5 µl Zelllysat wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>™</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %iges SDS-Gel (0,275 % statt 0,3 % BAA, s. 2.8.2) aufgetragen. Die PBP-Bocillin-Komplexe wurden nach ihrer Auftrennung mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde der Rezipient S. pneumoniae R6 verwendet, der Donor S. oralis Uo5 wurde ebenfalls aufgetragen. Rot unterlegt ist die Transformante O4, die für weitere Analysen verwendet wurde.

PBP 2x, 2a und 2b konnten gut aufgetrennt werden, dagegen laufen PBP 1a und 1b in einer Bande. Die Banden von S. oralis Uo5 können keinen PBPs zugeordnet werden, da aufgrund der sehr unterschiedlichen Aminosäuresequenz das Laufverhalten z.T. deutlich von dem der R6-PBPs abweicht. Bei allen Transformanten ist ein niederaffines PBP2x zu beobachten.

Für alle Transformanten wurden die MHKs für die β-Laktame Piperacillin, Oxacillin, Cefotaxim und Penicillin G bestimmt (Tab. 3.4). Die Detektion der Resistenzunterschiede erfolgte mittels des Plattenverdünnungstests, da diese Testmethode gerade im Bereich niedriger Antibiotikakonzentrationen eine feine und genaue Abstufung ermöglicht (s. 2.6.8.2).

Stamm	Piperacillin	Oxacillin	Cefotaxim	Penicillin G
	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
01	0,02	0,3	0,2	0,03
O2	0,02	0,4	0,3	0,02
O3	0,02	0,4	0,2	0,02
O4	0,02	0,4	0,2	0,02
O5	0,02	0,4	0,2	0,02
O6	0,02	0,3	0,2	0,02
07	0,02	0,4	0,3	0,02
O8	0,02	0,3	0,2	0,02
O9	0,02	0,4	0,2	0,02
O10	0,02	0,5	0,3	0,02
S. p. R6	0,01	0,07	0,01	0,01

Tah 34.1	R-I aktam-Resistenz	dor	O-Transformanten
1 av. 3.4.	p-Lakiani-Resisienz	uer	0-mansionnamen

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der O-Transformanten und des β-Laktam-sensitiven R6. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Rot unterlegt ist die Transformante O4, die für weitere Analysen verwendet wurde.

Alle O-Transformanten weisen höhere MHK-Werte für alle getesteten  $\beta$ -Laktame auf als der Parentalstamm R6. Die höchsten Werte stellten die für Oxacillin dar, allerdings handelte es sich dabei nur um einen 4- bis 7-fachen Anstieg im Vergleich zur MHK von R6. Die Cefotaxim-MHK war zwar in absoluter Zahl niedriger (0,2-0,3 µg/ml), was aber dem 20- bis 30-fachen Wert der MHK von R6 entsprach. Für Piperacillin und Penicillin G waren die MHK-Werte kaum erhöht (2-facher Anstieg der MHK von R6). Dies bestätigt, dass auch das PBP2x aus *S. oralis* Uo5 vor allem Resistenz gegen Cefotaxim vermittelt und dass auch Oxacillin zur Selektion eines niederaffinen PBP2x geeignet ist. Die geringen Schwankungen der MHK zwischen den zehn Transformanten wurden als nicht signifikant gewertet. Die Transformante O4 wurde stellvertretend für diese Selektionsstufe für weitere Analysen verwendet (s. Abb. 3.3).

## 3.2.2 Transformation von S. pneumoniae R6 unter Piperacillinselektion

Eine weitere Transformation mit chromosomaler Uo5 DNA wurde unter Piperacillinselektion durchgeführt. Da in Labormutanten PBP2b das erste hmw PBP ist, in dem Mutationen nach Piperacillinselektion auftreten (Hakenbeck *et al.*, 1994), wurde davon ausgegangen, dass auch das *S. oralis* Uo5 PBP2b durch Piperacillinselektion übertragbar sein sollte.

Selektioniert wurde mit Konzentrationen von 0,015 bis 0,04 µg/ml Piperacillin, also nur geringfügig über der MHK des R6 Stammes, da ein niederaffines PBP2b nur eine geringe Resistenz vermittelt.

Piperacillin [µg/ml]	Transformanten [cfu/ml]	Lebendkeimzahl [cfu/ml]	Transformations- effizienz [%]	Negativkontrolle [cfu/ml]
0,015	n.a.	9,15x10 <sup>7</sup>	n.b.	6,54x10 <sup>3</sup>
0,02	4,77x10 <sup>3</sup>	9,15x10 <sup>7</sup>	0,5x10 <sup>-2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>
0,025	2,25x10 <sup>3</sup>	9,15x10 <sup>7</sup>	0,25x10 <sup>-2</sup>	2x10
0,03	7,2x10 <sup>2</sup>	9,15x10 <sup>7</sup>	0,8x10 <sup>-3</sup>	0
0,035	1,4x10 <sup>2</sup>	9,15x10 <sup>7</sup>	0,15x10 <sup>-3</sup>	0
0,04	1x10	9,15x10 <sup>7</sup>	0,11x10 <sup>-4</sup>	0

#### Tab. 3.5: Selektion der P-Transformanten

Aufgeführt sind die Piperacillin-Selektionskonzentrationen und die dabei aus dem Transformationsansatz bzw. der Negativkontrolle (Transformationsansatz ohne DNA unter selektiven Bedingungen) jeweils hervorgegangene Anzahl an Kolonien. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert.

cfu: colony forming units; n.a.: nicht auszählbar aufgrund von Bakterienrasen auf der Selektionsplatte; n.b.: nicht bestimmbar

Insgesamt nahm die Anzahl der erhaltenen Transformanten mit steigender Selektionskonzentration deutlich ab (Tab. 3.5). Zur weiteren Untersuchung wurden insgesamt 20 Kolonien ausgewählt: je 5 Kolonien von der Platten mit 0,02 µg/ml und 0,025 µg/ml, aber auch 5 Kolonien von der 0,03 µg/ml, 4 Kolonien von der 0,035 µg/ml und die einzige Kolonie auf der 0,04 µg/ml Piperacillin-Platte. In Abbildung 3.4 sind die PBP-Profile einiger ausgewählter P-Transformanten zu sehen. Alle anderen Transformanten wiesen keine niederaffinen PBPs auf (nicht gezeigt).





Je 5  $\mu$ I Zelllysat wurden mit 3,75  $\mu$ M Bocillin<sup>TM</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %-iges SDS-Gel (0,275 % BAA, s. 2.8.2) aufgetragen. Die Detektion der Bocillin-PBP-Komplexe erfolgte bei 488 nm im FluorImager. Als Kontrolle wurde der Rezipient *S. p.* verwendet. Der Donor *S. o.* Uo5 wurde ebenfalls aufgetragen.

Entgegengesetzt der Erwartungen wies keine Transformante ein niederaffines PBP2b auf. Alle Transformanten zeigten ein PBP-Muster wie der Rezipient *S. pneumoniae* R6 (erste Spur in Abb. 3.4), abgesehen von der Transformanten P20, die offenbar ein niederaffines PBP2x enthält (letzte Spur). Rot unterlegt sind die zwei Transformanten, die für spätere Arbeiten relevant sind: die Transformante P2, die repräsentativ für diese Selektionsstufe steht und die Transformante P20.

Für die Transformanten P1-P10 und P20 wurde eine MHK-Bestimmung durchgeführt (Tab. 3.6).

Stamm	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]	Cefotaxim [µg/ml]
P1	0,03	0,09	0,03
P2	0,03	0,09	0,03
P3	0,03	0,09	0,03
P4	0,03	0,09	0,03
P5	0,03	0,08	0,03
P6	0,03	0,1	0,03
P7	0,03	0,09	0,03
P8	0,03	0,1	0,03
P9	0,03	0,09	0,03
P10	0,03	0,09	0,03
P20	0,06	1,5	0,4
S. p. R6	0,01	0,07	0,01

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der P-Transformanten und von *S. pneumoniae* R6. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Rot unterlegt sind die Transformanten P2 und P20, die für weitere Analysen verwendet wurden.

Alle Transformanten wiesen höhere MHK-Werte als der R6 auf (ca. 3-fach für Piperacillin und Cefotaxim, für Oxacillin betrug der Anstieg nur ca. 1,3-fach). Während P1-P10 dieselben MHK-Werte zeigten, wies P20 mit niederaffinem PBP2x deutlich höhere MHK-Werte im Vergleich zu P1-P10 auf. Der MHK-Wert für Piperacillin ist sechsfach erhöht im Vergleich zum R6, für Cefotaxim ist der Wert vierfach höher und für Oxacillin sogar 21-fach höher. Diese Werte lagen auch über denen der mit Oxacillin selektionierten Transformanten O1-10, ein Hinweis dafür, dass neben *pbp2x* möglicherweise auch noch andere Gene in P20 betroffen waren.

# 3.2.3 Übertragung von amplifiziertem *pbp2x* aus *S. oralis* Uo5 in *S. pneumoniae* R6

In Anbetracht der Tatsache, dass die zuvor beschrieben Transformationen mit chromosomaler DNA durchgeführt wurden und somit auch andere Gene außer *pbp2x* übertragen werden konnten, wurde eine Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit einem PCR-Fragment von *pbp2x* aus Uo5 durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Resistenz der Transformante O4 ausschließlich durch ein übertragenes *pbp2x* vermittelt

wurde, und ob neben dem *S. oralis* Uo5 *pbp2x* noch ein anderes Gen für die Resistenz von P20 verantwortlich ist. Dazu wurde *pbp2x* mit ca. 500 bp flankierenden Bereichen aus dem Donorstamm *S. oralis* Uo5 mit den Primern PM109/110 amplifiziert. Das erhaltene 3166 bp große Fragment wurde aus dem Agarosegel eluiert (s. 2.7.1) und in *S. pneumoniae* R6 unter Oxacillin-Selektion transformiert. Selektioniert wurde mit 0,07, 0,08 und 0,09 µg/ml Oxacillin (Tab. 3.7).

Oxacillin	Transformanten	Lebendkeimzahl	Transformations-	Negativkontrolle
[µg/ml]	[cfu/ml]	[cfu/ml]	effizienz [%]	[cfu/ml]
0,07	6,37x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	3,6x10 <sup>-3</sup>	5,13x10 <sup>3</sup>
0,08	1,89x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	3,9x10 <sup>2</sup>
0,09	7,6x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	0,4x10 <sup>-3</sup>	10

Die erhaltenen Ergebnisse bei der Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit amplifiziertem pbp2x aus *S. oralis* Uo5 unter Selektion von Oxacillin sind aufgelistet. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert. cfu: colony forming units

Die Transformationseffizienz ließ auf eine unproblematische Rekombination des PCR-Fragments schließen, wobei eine deutliche Abnahme der Anzahl der erhaltenen Transformanten mit steigender Selektionskonzentration zu beobachten war. Insgesamt wurden 12 Transformanten weiter untersucht, jeweils 6 von der 0,07 µg/ml Selektionsplatte bzw. der 0,08 µg/ml Selektionsplatte.

Die Übertragung von *pbp2x* wurde nach Bocillinmarkierung und Darstellung der PBP-Profile der Transformanten überprüft (Abb. 3.5). Zwei Arten von Transformanten konnten unterschieden werden: solche mit einem unverändertem PBP-Profil im Vergleich zum R6-Stamm, O(2x)3-7, und solche, die ein niederaffines PBP2x enthielten. Von letzteren wurde eine repräsentative Transformante für weitere Untersuchungen ausgewählt: O(2x)8.



#### Abb. 3.5: PBP-Profile der O(2x)-Transformanten

Die Zelllysate (je 5 µl) wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>™</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die PBP-Bocillin-Komplexe mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde der Rezipient *S. pneumoniae* R6 aufgetragen. Rot unterlegt ist die Transformante O(2x)8, die für weitere Analysen verwendet wurde.

Alle Transformanten mit R6-PBP-Profil [O(2x)3-7] wiesen keine Resistenz gegen Oxacillin auf, während diejenigen mit einem niederaffinen PBP2x [O(2x)1,2 und O(2x)8-12] eine MHK für Oxacillin von 0,3-0,4  $\mu$ g/ml aufwiesen (Tab. 3.8).

Stamm	Oxacillin [µg/ml]
O(2x)1	0,3
O(2x)2	0,3
O(2x)3	0,09
O(2x)4	0,09
O(2x)5	<0,08
O(2x)6	0,09
O(2x)7	<0,08
O(2x)8	0,4
O(2x)9	0,4
O(2x)10	0,4
O(2x)11	0,4
O(2x)12	0,3
R6	<0,08

MHK-Werte für Oxacillin wurden über den Plattenverdünnungstest ermittelt, wobei Konzentrationen von 0,08; 0,09 und 0,1 bis 0,5 µg/ml (in 0,1er Schritten) Oxacillin eingesetzt wurden. Rot unterlegt ist die Transformante O(2x)8, die für weitere Analysen verwendet wurde.

#### 3.2.4 Sequenzierung von pbp2x und Bestimmung der Rekombinationsstellen

Das PBP2x-Gen aus *S. oralis* Uo5 weist eine Mosaikstruktur auf, die sich auf DNA-Ebene in etwa 21 % von der *S. pneumoniae* R6-Sequenz unterscheidet. Diese Veränderungen führen zu ungefähr 15,5 % Unterschied auf Aminosäure-Ebene (Abb. 3.6).

```
79
   1
   MKWTKRVIR YATKNRKSPA ENRRRVGKSL SLLSVFVFAI FLVNFAVIIG TGTRFGTDLA KEAKKVHOTT RTVPAKRGTI
R6
80
                                              159
R6 YDRNGVPIAE DATSYNVYAV IDENYKSATG KILYVEKTQF NKVAEVFHKY LDMEESYVRE QLSQPNLKQV SFGAKGNGIT
Uo5
  160
                                              239
R6 YANMMSIKKE LEAAEVKGID FTTSPNRSYP NGQFASSFIG LAQLHENEDG SKSLLGTSGM ESSLNSILAG TDGIITYEKD
Uo5
  240
                                              319
R6 RLGNIVPGTE QVSQRTMDGK DVYTTISSPL QSFMETQMDA FQEKVKGKYM TATLVSAKTG EILATTQRPT FDADTKEGIT
Uo5
  399
  320
  EDFVWRDILY QSNYEPGSTM KVMMLAAAID NNTFPGGEVF NSSELKIADA TIRDWDVNEG LTGGRMMTFS QGFAHSSNVG
Rб
  UO5
400
                                              479
  MTLLEQKMGD ATWLDYLNRF KFGVPTRFGL TDEYAGQLPA DNIVNIAQSS FGQGISVTQT QMIRAFTAIA NDGVMLEPKF
Rб
Uo5
  2349 .S.....K.
                    480
                                              559
  ISAIYDPNDQ TARKSQKEIV GNPVSKDAAS LTRTNMVLVG TDPVYGTMYN HSTGKPTVTV PGQNVALKSG TAQIADEKNG
Rб
Uo5
  .....T.N. SV......V....E... T..NH.I... ..L.......Y...II....V....V...
2349 .....T.N. SV.....V....E... T..NH.I... ..L.......Y...II....V...
  560
                                              639
  GYLVGLTDYI FSAVSMSPAE NPDFILYVTV QQPEHYSGIQ LGEFANPILE RASAMKDSLN LQTTAKALEQ VSQQSPYPMP
Rб
  UO5
719
  640
  SVKDISPGDL AEELRRNLVQ PIVVGTGTKI KNSSAEEGKN LAPNQQVLIL SDKAEEVPDM YGWTKETAET LAKWLNIELE
Rб
  . \verb! .... \verb! E. ..A ... \verb! I. .... \verb! ET.V...T. .... \verb! L. ...V..! \verb! .... K..... F...D .... \\
Uo5
720
                  750
R6 FQGSGSTVQK QDVRANTAIK DIKKITLTLG D
  .E....V... .....T.... N....K.... .
Uo5
2349 .E....V... ....T.... N....K.... .
```

#### Abb. 3.6: Vergleich von PBP2x aus S. pneumoniae R6, S. oralis Uo5 und S. pneumoniae 2349

Gezeigt ist die Proteinsequenz von PBP2x aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5. Zur R6-Sequenz identische Aminosäure-Positionen sind als Punkte dargestellt. Blau hinterlegt ist die Transpeptidase-Domäne, und rote Buchstaben stellen die konservierten Boxen dar. Die PBP2x-Sequenz von *S. pneumoniae* 2349 des Klons Spain1-<sup>23F</sup> ist ebenfalls aufgeführt. Unterschiede in der Transpeptidase-Domäne zwischen PBP2x von *S. pneumoniae* 2349 gegenüber der *S. oralis* Uo5-Sequenz sind rot hinterlegt.

PBP2x aus *S. oralis* Uo5 weist viele Veränderungen über die gesamte Länge des Proteins im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 auf. In der Transpeptidase-Domäne alleine sind 37 Austausche zu beobachten. Für eine Reihe davon, u.a. T<sub>338</sub>G in der konservierten STMK-Box, L<sub>364</sub>F, I<sub>371</sub>T, R<sub>384</sub>S oder L<sub>546</sub>V in unmittelbarer Nähe des KSG-Box wurde schon beschrieben, dass sie an der Penicillin-Resistenz beteiligt sind bzw. eine Reduktion der Acylierungseffizienzen für Penicillin G und Cefotaxim bewirken (Carapito *et al.*, 2006; Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998, Smith und Klugman, 2005; Zerfass, 2010). Auffallend ist die Ähnlichkeit der Sequenz zu dem Mosaikblock von PBP2x des hochresistenten spanischen *S. pneumoniae* Klons Spain1-<sup>23F</sup>, der sich nur in vier Aminosäuren in der Transpeptidase-Domäne vom Uo5-PBP2x unterscheidet (s. Abb. 3.6).

Um beurteilen zu können, welcher Bereich von dem *S. oralis pbp2x* in den Transformanten übertragen wurde, wurde *pbp2x* in den drei ausgewählten Transformanten mit niederaffinem PBP2x P20, O4 und O(2x)8 sequenziert. Zudem wurden durch Sequenzierung der flankierenden Bereiche die Rekombinationsstellen ermittelt (Abb. 3.7). Alle drei sequenzierten Transformanten haben DNA von *S. oralis* Uo5 aufgenommen. PBP2x von O4 wurde komplett ausgetauscht, P20 besitzt nur einen Teil des 3'-Endes (ab bp 853) von *pbp2x* und einen großten Teil von *mraY* aus Uo5, während in O(2x)8 nur die zentrale Transpeptidase-Domäne ausgetauscht ist. Bei letzterem war allerdings nicht zu erwarten, dass große Bereiche um *pbp2x* ausgetauscht wurden, da diese Transformante mit einem Amplifikat von *pbp2x* enthielt. Der größte Block Uo5-DNA wurde in O4 rekombiniert und umfasst die Gene *yllC*, *ftsL*, *pbp2x* und *mraY*.





Dargestellt ist schematisch die genetische Organisation von *pbp2x* aus *S. pneumoniae* R6. Gene sind als graue Pfeile dargestellt. Die Bereiche um *pbp2x* in den drei 2x-Transformanten sind unten gezeigt, wobei weiße Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. pneumoniae* R6 und schwarze Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. oralis* Uo5 entsprechen. Die Grenzen der ausgetauschten Bereiche sind als Entfernung von der ersten Base von *pbp2x* angegeben, die als 1 definiert wurde. Die Transpeptidase-Domäne von *pbp2x* ist als schwarzes Rechteck dargestellt.

## 3.2.5 MHK-Vergleich der drei *pbp2x*-Transformanten

Da bei den drei oben beschriebenen *pbp2x*-Transformanten unterschiedlich große Bereiche von *pbp2x* ausgetauscht wurden, stellte sich die Frage, ob sich diese Unterschiede in der Höhe der vermittelten Resistenz widerspiegeln. Durch den direkten Vergleich der MHK-Werte der drei *pbp2x*-Transformanten sollte zudem festgestellt werden, ob bei den Transformanten, hergestellt mit chromosomaler DNA, ausschließlich das ausgetauschte *pbp2x* ausschlaggebend für die Resistenzerhöhung war. In diesem Fall sollte die MHK dieser Stämme gleich sein mit der des Stammes O(2x)8, hergestellt mit amplifiziertem *pbp2x*, da hier davon auszugehen ist, dass nur dieses Gen übertragen wurde. In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse des MHK-Vergleichs dieser drei Stämme aufgelistet.

Stamm	MHK [µg/ml]			
	Cefotaxim	Piperacillin	Oxacillin	
O4	0,2	0,02	0,4	
P20	0,4	0,06	1,5	
O(2x)8	0,2	0,02	0,4	

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der PBP2x-Transformanten. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Die MHK Bestimmung wurde mindestens zweimal durchgeführt.

Die Übereinstimmung der erhaltenen MHK-Werte der Transformanten O4 und O(2x)8 spricht dafür, dass bei dem Stamm O4 die  $\beta$ -Laktam-Resistenz ausschließlich auf *pbp2x* 

zurückzuführen ist. Abbildung 3.7 zeigt, dass in diesem Stamm zusätzlich zu *pbp2x* die Gene *mraY*, *ftsL* und zum Teil *yllC* übertragen worden sind. Der gleiche Resistenzlevel von O4 und O(2x)8 spricht allerdings dafür, dass diese zusätzlich übertragenen Gene keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Laktam-Resistenzerhöhung haben. Da die Transpeptidase-Domäne der einzige Bereich ist, der in beiden Transformanten ausgetauscht ist, müssen dort auch die Veränderungen liegen, die für die Resistenz verantwortlich sind. Die Transformante P20 fällt mit viel höheren MHK-Werte im Vergleich zu den anderen zwei Stämmen auf (Piperacillin dreifach höher, Oxacillin ca. vierfach höher und Cefotaxim zweifach höher). Dies bestätigt die Vermutung, dass in diesem Stamm noch andere Gene an der Resistenz beteiligt sein müssen (s. Kap. 3.5).

## 3.3 Transfer von pbp1a aus S. oralis Uo5

Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch sukzessive Transformation die β-Laktam-Resistenz von *S. oralis* Uo5 so weit wie möglich in *S. pneumoniae* R6 zu übertragen. Die Transformante P20 mit der höchsten Resistenz aller *pbp2x*-Transformanten zeigte sich hierbei als der passende Rezipient für eine weitere Transformation mit chromosomaler DNA.

Diese erfolgte unter Selektion mit Cefotaxim, d.h. Bedingungen, unter denen der Transfer von *pbp1a* und/oder *pbp2a* klinischer Isolate beschrieben war (Laible und Hakenbeck, 1987; Muñoz *et al.*, 1992; Reichmann, 1997). Mutationen, die zu einem niederaffinen PBP2a führen, konnten auch in Labormutanten selektioniert werden und spielen eine Rolle in der Cefotaxim-Resistenz (Laible und Hakenbeck, 1987; Rutschmann und van der Linden, unveröffentlicht). Selektioniert wurde auf Konzentrationen von 0,4 bis 0,6  $\mu$ /ml Cefotaxim. Auf den 0,4 und 0,5  $\mu$ g/ml Selektionsplatten war eine große Anzahl von Transformanten zu verzeichnen. Um solche mit einer besonders hohen Resistenz zu erhalten, wurden zur weiteren Untersuchung 12 Kolonien von der 0,6  $\mu$ /ml Selektionsplatte gepickt; die Transformationseffizienz war hier deutlich geringer.

Das Resistenzpotential der Transformanten PC1-12 [P (Piperacillin) und C (Cefotaxim)] wurde mittels des Plattenverdünnungstests überprüft (Tab. 3.10).

Transformante	Cefotaxim [µg/n	nl]
PC1	>1,0	1,6*
PC2	0,7	
PC3	>1,0	2*
PC4	0,9	
PC5	0,7	
PC6	0,8	
PC7	0,7	
PC8	0,7	
PC9	0,8	
PC10	0,7	
PC11	0,7	
PC12	0,7	
P20	0.4	

Tab. 3.10: MHK-Wer	e für Cefotaxim d	er Transformanten	PC1-PC12

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte für Cefotaxim der PC-Transformanten im Vergleich zu denen des Rezipienten P20. Die gewählten Konzentrationen reichten von 0,3 bis 1,0 in 0,1er Schritten. Rot unterlegt ist die Transformante PC3, die für weitere Analysen verwendet wurden. \*: MHK-Werte, bestimmt in späteren Experimenten.

Alle Transformanten zeigten ca. zweifach höhere MHK-Werte für Cefotaxim im Vergleich zum Rezipient P20. Die zwei Transformanten PC1 und PC3 wiesen die höchste MHK von allen erhaltenen Transformanten auf, die zwischen 1,6 und 2 µg/ml lag (4- bis 5-facher Anstieg der Cefotaxim-Resistenz im Vergleich zum Rezipient P20).

Um zu überprüfen, ob und welche PBPs in den erhaltenen Transformanten aus dem Donorstamm *S. oralis* Uo5 übertragen wurden, wurden die PBP-Profile der Transformanten analysiert (Abb. 3.8). Zehn der zwölf getesteten Transformanten wiesen wie der Ausgangsstamm nur ein niederaffines PBP2x auf. Dagegen konnte bei Transformante PC1 und PC3 keine Bande auf der Höhe von PBP1a detektiert werden, was auf ein niederaffines PBP1a deutet. Rot unterlegt in Abb. 3.8 ist die Transformante PC3, welche als Rezipient für die dritte Transformationsstufe verwendet wurde.



Abb. 3.8: PBP-Profile der PC-Transformanten

Je 5 µl Zelllysat wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>™</sup>FL (final) 10 min bei 37℃ inkubiert, und die Proteine auf einem 7,5 %-igen SDS-Gel (0,275 % BAA, s. 2.8.2) aufgetrennt. Die PBP-Bocillin-Komplexe wurden anschließend mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde der Rezipient *S. pneumoniae* R6 verwendet. Aufgetragen wurden zudem der Donor *S. oralis* Uo5.

#### Sequenzierung von *pbp1a* und Bestimmung der Rekombinationsbereichen

Um feststellen zu können, welche Bereiche von *pbp1a* übertragen wurden und wie groß der Rekombinationsbereich ist, wurde *pbp1a* und seine flankierenden Regionen in den Transformanten PC1 und PC3 sequenziert. Abbildung 3.9 zeigt schematisch die genetische Organisation von *pbp1a* in *S. pneumoniae* R6 und die *pbp1a*-Rekombinationsstellen in den Transformanten PC1 und PC3.



Abb. 3.9: Rekombinationsstellen von *pbp1a* aus *S. oralis* Uo5 in den PC1- und PC3-Transformanten

Dargestellt ist schematisch die genetische Organisation von *pbp1a* aus *S. pneumoniae* R6. Gene sind als graue Pfeile dargestellt. Die Bereiche rekombinierter Uo5-DNA um *pbp1a* in den Transformanten sind unten dargestellt, wobei weiße Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. pneumoniae* R6 und schwarze Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. oralis* Uo5 entsprechen. Die Grenzen der ausgetauschten Bereiche sind als Entfernung von der ersten Base von *pbp1a* angegeben, die als 1 definiert wurde. Die Transpeptidase-Domäne von *pbp1a* ist als schwarzes Rechteck dargestellt.

Beide sequenzierten Transformanten haben DNA von *S. oralis* Uo5 aufgenommen, die mindestens die Transpeptidase-Domäne sowie die C-terminale Domäne von PBP1a überdecken (schwarze Sequenzblöcke). In der Transformante PC1 wurde *pbp1a* ab Base 280 ausgetauscht. Diese Transformante enthält zudem die ersten 55 Basen des downstream gelegenen Gens *spr0328*. Die Transformante PC3 enthält die komplette *pbp1a*-Sequenz aus *S. oralis* Uo5. Der *S. oralis*-Block beginnt 195 Basen vor dem Startkodon von *pbp1a*, in dem Gen *recU*, und endet 317 Basen nach dem *pbp1a*-Stoppkodon, in *spr0328*.

Das PBP1a-Gen aus *S. oralis* Uo5 ist über die gesamte Länge variabel, insgesamt unterscheidet sich das Gen in etwa 21 % von der *S. pneumoniae* R6-Sequenz. Diese Veränderungen führen zu ungefähr 16,7 % Unterschied auf Aminosäure-Ebene (Abb. 3.10).

	1							80
R6	MNKPTILRLI	KYLSISFLSL	VIAAIVLGGG	VFFYY <mark>VSKAP</mark>	SLSESKLVAT	TSSKIYDNKN	QLIADLGSER	RVNAQANDIP
Uo5	Q.FIA	VL.TV	$\texttt{F}\ldots\texttt{V}\texttt{M}\ldots$	L.L	Ε	$\dots \dots SND$	Ε	E
	81							160
Rб	TDLVKAIVSI	EDHRFFDHRG	IDTIRILGAF	LRNLQSNS-L	QGGSALTQQL	IKLTYFSTST	SDQTISRKAQ	EAWLAIQLEQ
Uo5	N	N	T	RGGGG.	A.T		L	V
	161							240
R6	KATKQEILTY	YINKVYMSNG	NYGMQTAAQN	YYGKDLNNLS	LPQLALLAGM	PQAPNQYDPY	SHPEAAQDRR	NLVLSEMKNQ
Uo5			S	KD	I		E	G.
	241							320
R6	GYISAEQYEK	AVNTPITDGL	QSLKSASNYP	AYMDNYLKEV	INQVEEETGY	NLLTTGMDVY	TNVDQEAQKH	LWDIYNTDEY
Uo5		.I	NS	₽	.DQ		PKV.Q.	
	321							400
R6	VAYPDDELQV	ASTIVDVSNG	KVIAQLGARH	QSSNVSFGIN	QAVETNRDWG	<b>STMK</b> PITDYA	PALEYGVYES	TATIVHDEPY
Uo5	.NM	T	S	.AT.		.S	D.	SV
	401							480
R6	NYPGTNTPVY	NWDRGYFGNI	TLQYALQQSR	NVPAVETLNK	VGLNRAKTFL	NGLGIDYPSI	HYSNAISSNT	TESDKKYGAS
005	DL.	HV	.1	T	D	M	A	N.Q
	401							5.00
DC	481		MUTHUMBOD	CORVERONTO			OVCE CENTRAL	560
R6	SEKMAAAYAA	FANGGTYYKP	MYTHKVVFSD	GSEKEFSNVG	TRAMKETTAY	MMTDMMKTVL	SIGIGRNAIL	AWLPQAGKTG
005		H	N.1	SYADS.		···E·····	AG	P
	F C 1							640
DC				TAX ON A THIRDAY				040
K0 UpE	ISNYIDEELE	NHIKISQFVA	PDELFAGIIR	KISMAVWIGI	SNRLIPLVGN	GLIVAAKVIR	SMMITLSEGS	NPEDWNIPEG
005		.YNIGY	M.V		D		DN	GIM
	641							700
Ъб	UTT	NCADOTHCOD				NOTITINI	TOOSNTTDOO	/20
ILO E	DIRNGEFVER	NGARSIWSSP	APQQPPSIES	נונפתפפפס <mark>פ</mark> שיד	Q222115211			
005		A.IA.	A.IP	••••		••••••••••••	rG.	•••••
	721							
R6								
IIO5	TÄLVÄL							
005	•••••							



Gezeigt ist die Proteinsequenz von PBP1a aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5. Zur R6-Sequenz identische Aminosäure-Positionen sind als Punkte dargestellt. Striche stellen in einem der beiden Stämme fehlende Aminosäuren dar. Blau hinterlegt ist die Transpeptidase-Domäne, wobei rote Buchstaben die konservierten Boxen darstellen. Gelb hinterlegt ist die Transglykosylase-Domäne.

PBP1a aus *S. oralis* Uo5 zeigt mehrere Veränderungen in der gesamten Länge des Proteins im Vergleich zum sensitiven *S. pneumoniae* R6. Zudem ist das Uo5-Protein 5 Aminosäuren länger als das Homolog in *S. pneumoniae* R6. Aminosäure-Austausche sind in der extrazellulären Domäne (AS 1-11), in der Transmembrandomäne (AS 12-36), sowie in den Transglykosylase- und Transpeptidase-Domänen zu finden. In der Transpeptidase-Domäne alleine sind 57 Aminosäure-Austausche vorhanden. Die bereits in resistenten Stämmen beschriebene resistenzrelevante T<sub>371</sub>S-Substitition im konservierten STMK-Motiv ist in der Uo5-Sequenz vorhanden (hier S<sub>372</sub>), wobei in S. pneumoniae PBP1a häufiger T<sub>371</sub>A vorkommt (Asahi und Ubukata, 1998; Ferroni und Berche, 2001; Job *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2002; Nichol *et al.*, 2002; Smith und Klugman, 1998). Die Position T<sub>371</sub> stellt eine Schlüsselposition bei der Entwicklung der Penicillinresistenz dar und ist vergleichbar mit der Position T<sub>338</sub> in der STMK-Box in PBP2x. Weiterhin besitzt PBP1a aus *S. oralis* Uo5 die vier aufeinander folgenden Aminosäure-Substitutionen T<sub>574</sub>N, S<sub>575</sub>T, Q<sub>576</sub>G und F<sub>577</sub>Y hinter der KTG-Box (entsprechen in diesem Alignment Positionen 575 bis 578), die bereits in klinischen Isolaten beschrieben wurden und für intermediäre Penicillin-Resistenz verantwortlich sind (Ferroni und Berche, 2001; Job *et al.*, 2008; Sanbongi *et al.*, 2004; Smith und Klugman, 1998; Smith und Klugman, 2003). Desweiteren besitzt Uo5 die bekannten L<sub>583</sub>M, A<sub>585</sub>V und P<sub>432</sub>T-Mutationen (hier L<sub>584</sub>M, A<sub>586</sub>V und P<sub>433</sub>T), wobei die letzte bei hochresistenten Isolaten mit einer MHK für Penicillin  $\geq$  2 µg/ml beobachtet wurde (Nichol *et al.*, 2002; Smith und Klugman, 1998).

## 3.4 Transfer von pbp2b aus S. oralis Uo5

# 3.4.1 Übertragung von *pbp2b* aus *S. oralis* Uo5 mittels Transformation chromosomaler DNA

Durch eine nachfolgende Transformation mit chromosomaler Uo5-DNA wurde versucht das *S. oralis* Mosaik-PBP2b in dem zuvor hergestellten Stamm PC3 zu übertragen. Hierzu wurde auf Piperacillinkonzentrationen von 0,06 µg/ml bis 0,11 µg/ml selektioniert (Tab. 3.11).

Piperacillin [µg/ml]	Transformanten [cfu/ml]	Lebendkeimzahl [cfu/ml]	Transformations- effizienz [%]	Negativkontrolle [cfu/ml]
0,06	n.a.	n.a.	n.b.	n.a.
0,07	210	1,43x10 <sup>8</sup>	0,15 x10 <sup>-3</sup>	50
0,08	110	1,43x10 <sup>8</sup>	0,77 x10 <sup>-4</sup>	40
0,09	20	1,43x10 <sup>8</sup>	0,14 x10 <sup>-4</sup>	70
0,1	30	1,43x10 <sup>8</sup>	0,2 x10 <sup>-4</sup>	40
0,11	10	1,43x10 <sup>8</sup>	0,07 x10 <sup>-4</sup>	10

Tab. 3.11: Selektion der PCP-Transformanten

Aufgeführt sind die erhaltenen Ergebnisse bei der Herstellung der PCP-Transformanten. Die Piperacillin-Selektionskonzentrationen und die dabei aus dem Transformationsansatz bzw. der Negativkontrolle jeweils hervorgegangene Anzahl an Kolonien sind aufgelistet. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert.

cfu: colony forming units; n.a.: nicht auszählbar aufgrund von Bakterienrasen auf der Selektionsplatte; n.b.: nicht bestimmbar

Auffallend bei diesem Transformationsexperiment war die geringe Anzahl der erhaltenen Transformanten bei Selektionskonzentrationen ab 0,07  $\mu$ g/ml, und ein sehr geringer Unterschied zwischen Transformanten und Kolonien auf der Negativkontrolle. Die Selektionskonzentration von 0,06  $\mu$ g/ml lag offenbar zu nahe an der MHK des Ausgangsstammes, da hier nicht zwischen Transformanten und Kontrollen unterscheiden werden konnte, während bei 0,09  $\mu$ g/ml und höher keine Transformanten mehr erhalten wurden. Nur in einem engen Fenster zwischen 0,07 und 0,08  $\mu$ g/ml konnte ein geringer Unterschied zwischen Anzahl der Transformanten und Kolonien auf der Negativkontrolle

beobachtet werden. Zur weiteren Untersuchung wurden 13 Kolonien gepickt (jeweils sechs von der 0,07 und 0,08  $\mu$ g/ml Piperacillin Selektionsplatte und die einzige Transformante auf der 0,11  $\mu$ g/ml Piperacillin Selektionsplatte). Die PBP-Profile der Transformanten wurden untersucht, um feststellen zu können, ob PBP2b niederaffin war (Abb. 3.11).



Abb. 3.11: PBP-Profile der PCP-Transformanten

Je 5  $\mu$ I Zelllysat wurden mit 3,75  $\mu$ M Bocillin<sup>TM</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %iges SDS-Gel (0,275 % BAA, s. 2.8.2) aufgetragen. Die PBP-Bocillin-Komplexe wurden nach ihrer Auftrennung mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde das Lysat des Rezipienten *S. pneumoniae* R6 verwendet.

Da die Transformanten aus dem Stamm PC3 entstanden sind, besitzen alle Transformanten niederaffine PBP2x und PBP1a, die entsprechend bei der ersten (s. 3.2.2) und zweiten Transformationsstufe (s. 3.3) übertragen wurden. Die Analyse der PBP-Profile zeigte, dass zusätzlich ein niederaffines PBP2b in den Transformanten PCP7 und PCP13 vorliegt. Rot unterlegt ist die Transformante PCP7, die später als Rezipient für eine weitere Transformationsstufe diente.

Zur Beurteilung des Resistenzpotentials der erhaltenen Transformanten wurde die MHK für die β-Laktame Piperacillin, Oxacillin und Cefotaxim mittels des Plattenverdünnungstests bestimmt (Tab. 3.12). Als Kontrolle wurde zudem die MHK des Rezipienten PC3 bestimmt

Stomm Dinoropillin [ug/m]]					Cofotoxim [ug/m]]		
Stamm	Piperacillin [µg/mi]		Oxacillin [µg/mi]		Cerotaxim [µg/mi]		
PCP1	0,18		2,1		2,2		
PCP2	0,2		4		2,8		
PCP3	0,2		3,5		1,9		
PCP4	0,2		2,7		2,5		
PCP5	0,2		>4		2,2		
PCP6	0,2		4		3		
PCP7	>0,2	2,5-3*	>4	20-24*	>3	2,5-3*	
PCP8	0,2		4		2,5		
PCP9	0,2		4		2,7		
PCP10	0,2		4		1,8		
PCP11	0,2		4		2,7		
PCP12	0,2		4		1,8		
PCP13	>0,2		>4		>3		
PC3	0,09		<2		1,9		

Tab. 3.12: β-Laktam-Resistenz der PCP-Transformanten

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der PCP-Transformanten und des Rezipienten PC3. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Rot unterlegt sind die Transformanten PCP7, die für weitere Experimente verwendet wurde. \*: MHK-Werte, bestimmt in späteren Experimenten.

Die Transformanten zeigten vor allem bei der MHK für Oxacillin eine relativ große Heterogenität. Die drei Transformanten PCP5, 7 und 13 hatten die höchste MHK mit >4  $\mu$ g/ml, wobei PCP7 und PCP13 mit zusätzlichem niederaffinen PBP2b auch die höchsten MHKs für Piperacillin und Cefotaxim zeigten. Die Transformante PCP7, die für weitere Experimente verwendet wurde, zeigte einen ca. 1,7-fachen Anstieg der Cefotaxim-Resistenz im Vergleich zum Rezipienten PC3. Für Oxacillin lagen die Werte zwischen 20 und 24  $\mu$ g/ml, was eine 10-fache Erhöhung der Resistenz ausmacht. Für Piperacillin wurde jedoch mit Werten zw. 2,5 und 3  $\mu$ g/ml der größte Anstieg beobachtet (25- bis 30-fach). Somit haben die Transformanten mit der höchsten Resistenz Veränderungen in allen drei für die  $\beta$ -Laktam-Resistenz wichtigsten PBPs (PBP2x, PBP1a und PBP2b). Die übertragene Resistenz liegt jedoch weit unter der des Donors Uo5 (s. Tab. 3.2) und zeigt, dass diese drei PBPs zwar eine entscheidende Rolle für die  $\beta$ -Laktam-Resistenzentwicklung in Uo5 spielen, aber nicht ausreichend für die volle Resistenz sind.

## Sequenzierung von *pbp2b* in der Transformante PCP7 und Bestimmung der Rekombinationsbereichen

Um zu überprüfen, wie groß der ausgetauschte Bereich von *pbp2b* in der Transformante PCP7 ist, wurde *pbp2b* und seine flankierenden Regionen sequenziert (Abb. 3.12).



Abb. 3.12: Rekombinationsstellen von pbp2b aus S. oralis Uo5 in der Transformante PCP7

Dargestellt ist schematisch die genetische Organisation von *pbp2b* aus *S. pneumoniae* R6. Graue Pfeile stellen Gene dar. Die Bereiche um *pbp2b* in den Transformanten sind unten dargestellt, wobei weiße Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. pneumoniae* R6 und schwarze Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. oralis* Uo5 entsprechen. Die Grenzen der ausgetauschten Bereiche sind als Entfernung von der ersten Base von *pbp2b* angegeben, die als 1 definiert wurde. Die Transpeptidase-Domäne von *pbp2b* ist als schwarzes Rechteck dargestellt.

Das PBP2b-Gen war nicht komplett ausgetauscht; der rekombinierte Bereich hörte bei Base 1350 auf, fing allerdings 320 Basen vor dem Startkodon von *pbp2b* an. Die Transpeptidase-Domäne von PBP2b, die sich von Aminosäure 345 bis 670 erstreckt (Basen 1035 bis 2010) ist in der Transformante nur zum Teil ausgetauscht.

Das PBP2b-Gen aus *S. oralis* Uo5 unterscheidet sich in etwa 24 % von der *pbp2b*-Sequenz des sensitiven *S. pneumoniae* R6-Stammes. Auf Aminosäure-Ebene machen diese Veränderungen ungefähr 16 % Unterschied aus. In Abbildung 3.13 ist der Proteinvergleich von PBP2b aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 dargestellt.

```
80
    MRKFNSHSIP IRLNLLFSIV ILLFMTIIGR LLYMQVLNKD FYEKKLASAS QTKITSSSAR GEIYDASGKP LVENTLKQVV
 R6
Uo5
    .....A....A.....A......T......RV.T....Q....A.....V....
    81
                                                                                     160
    SFTRSNKMTA TDLKETAKKL LTYVSISSPN LTERQLADYY LADPEIYKKI VEALPSEKRL DSDGNRLSES ELYNNAVDSV
Rб
Uo5
    ....N. AE...... NVT.D ..D.I... ...QD....T ..S...D... ......A T.....E.I
    161
                                                                                     240
Rб
    QTSQLNYTED EKKEIYLFSQ LNAVGNFATG TIATDPLNDS QVAVIASISK EMPGISISTS WDRKVLETSL SSIVGSVSSE
Uo5
    \mathsf{DV},\ldots,\mathsf{D}, \mathsf{Q},\ldots,\ldots,\mathsf{E},\ldots,\mathsf{S},\ldots,\mathsf{S},\ldots,\mathsf{A},\mathsf{D},\mathsf{T},\ldots,\mathsf{L},\ldots,\mathsf{L},\ldots,\mathsf{D},\ldots,\mathsf{D},\ldots,\mathsf{T},\ldots,\mathsf{N},
                                                                                     320
    241
    KAGLPAEEAE AYLKKGYSLN DRVGTSYLEK QYEETLQGKR SVKEIHLDKY GNMESVDTIE EGSKGNNIKL TIDLAFQDSV
R6
    .S.....VD ......K......V..... T......H .D....EN......K....
Uo5
    321
                                                                                     400
    DALLKSYFNS ELENGGAKYS EGVYAVALNP KTGAVLSMSG IKHDLKTGEL TPDSLGTVTN VFVPGSVVKA ATISSGWENG
R6
     .S.....A....R.. .....A... M..NVE.... .T.....
Uo5
     401
                                                                                     480
    VLSGNOTLTD OSIVFOGSAP INSWYTOAY- GSFPITAVOA LEYSSNTYMV OTALGLMGOT YOPNMFVGTS NLESAMEKLR
Rб
Uo5
    481
                                                                                     560
    STFGEYGLGT ATGIDLPDES TGFVPKEYSF ANYITNAFGQ FDNYTPMQLA QYVATIANNG VRVAPRIVEG IYGNNDKGGL
Rб
Uo5
      .....V S.E..... ....I.QKFDL ...L......
                                                           .....H....
                                                                               ..D.....
     561
                                                                                     640
    GDLIQQLQPT EMNKVNISDS DMSILHQGFY QVAHGTSGLT TGRAFSNGAL VSISGKTGTA ESYVADGQQA TNTNAVAYAP
Rб
Uo5
    .E...AIDTK .I.....E. ..A...... ..S....P.. .....D..T .......G .....G..D. N......
     641
                                             681
     SDNPQIAVAV VFPHNTNLTN GVGPSIARDI INLYQKYHPM N
Rб
Uo5
    TE.....NQH....
```

#### Abb. 3.13: Proteinvergleich von PBP2b aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Der Vergleich der Proteinsequenz von PBP2b aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 ist hier dargestellt. Zur R6-Sequenz identische Aminosäure-Positionen sind als Punkte dargestellt. Striche stellen in einem der beiden Stämme fehlende Aminosäuren dar. Blau hinterlegt ist die Transpeptidase-Domäne, wobei rote Buchstaben die konservierten Boxen darstellen.

Das Protein aus dem hochresistenten *S. oralis* weist mehrere Aminosäureveränderungen auf, 52 davon in der Transpeptidase-Domäne. Zwei Substitutionen in PBP2b, T<sub>446</sub>A/S und E<sub>476</sub>G, die auch hier (T<sub>447</sub>A und E<sub>477</sub>G) vorzufinden sind, sind in klinischen resistenten Stämmen beschrieben. Die Bedeutung dieser zwei Mutationen für die β-Laktam-Resistenz ist in mehreren Studien gezeigt (Dowson *et al.*, 1989b, Ferroni und Berche, 2001; Sanbongi *et al.*, 2004; Smith und Klugman, 1995). Die T<sub>446</sub>A-Mutation, direkt nach der SSN-Box, ist bei allen resistenten Pneumokokken-Stämmen vorzufinden, nicht aber in sensitiven *S. pneumoniae* und *S. mitis*-Stämmen. Diese Mutation konnte zudem in Laborstämmen selektioniert werden (Grebe und Hakenbeck, 1996) und ist die einzige PBP2b-Substitution, die biochemisch charakterisiert wurde. Die T<sub>446</sub>A-Mutation führt zu 60 % Reduktion der PBP2b-Affinität zu Penicillin G (Pagliero *et al.*, 2004). Eine weitere wichtige Mutation für die Entwicklung der Penicillin-Resistenz ist die A<sub>619</sub>G-Substitution (in dem gezeigten Alignment A<sub>620</sub>G) nach dem KTG-Motiv. Diese Mutation wurde in klinischen Pneumokokken Stämme aus Japan, sowie in dem hochresistenten *S. mitis* B6 beschrieben (Hakenbeck *et al.*, 1998; Sanbongi *et al.*, 2004). Desweiteren besitzt Uo5 die Mutation G zu N an Position 660 (hier Position 661), die in Piperacillin-resistenten Laborstämme selektioniert wurde, allerdings als  $G_{660}D$  (Hakenbeck *et al.*, 1994).

#### 3.4.2 PBP2b aus S. oralis Uo5 als primäre Resistenzdeterminante

Da PBP2b ein primäres Target für β-Laktamantibiotika darstellt und es in keiner der bisher durchgeführten Transformationen mit chromosomaler DNA alleine übertragen werden konnte, sollte abschließend versucht werden, R6-Transformanten mit einem pbp2b-PCR-Fragment zu erhalten. Dadurch konnte vermieden werden, dass ein anderes Gen, was sich besser selektionieren lässt und ebenfalls Piperacillin-Resistenz vermittelt, transformiert werden kann. Dabei könnte auch geklärt werden, welchen Resistenzanstieg das Uo5-PBP2b Selektioniert wurde auf 0,02 µg/ml alleine bewirkt. Piperacillin. Bei einer Transformationseffizienz von 0,6x10<sup>-2</sup> % und einem Verhältnis von 144 Transformanten zu 27 Kolonien auf der Platte der Negativkontrolle wurden zehn Transformanten zur weiteren Untersuchung gepickt. Nur eine davon zeigte in ihrem PBP-Profil ein niederaffines PBP2b. Eine Übertragung von S. oralis-pbp2b als erstes PBP erwies sich somit zwar als schwierig aber nicht unmöglich. Offenbar vermittelt PBP2b nur eine sehr geringe Resistenz, d.h. der Konzentrationsbereich für die Selektion ist sehr schmal. Der Austausch von pbp2b in der Transformante P(2b) beschränkte sich auf 20 Basen in der Transpeptidase-Domäne und resultierte in einer einzigen Substitution auf Aminosäure-Ebene: T<sub>446</sub>A nach der konservierten SSN-Box (s. Abb. 3.15). Die T<sub>446</sub>A-Substitution konnte die MHK des Wildtyp-Stammes für Oxacillin nicht erhöhen, bewirkte jedoch einen 5-fachen Anstieg der Piperacillin-MHK (von 0,01 µg/ml in R6 auf 0,05 µg/ml in der Transformante) und eine 2fache Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz (s. Tab. 3.13).

## 3.4.3 Beitrag von PBP2b in der β-Laktam-Resistenz von *S. oralis* Uo5 in Verbindung mit Mosaik-PBP2x

Um einen Überblick zu bekommen, was für ein Resistenzniveau der Austausch beider primärer Resistenzdeterminanten, PBP2x und PBP2b, zusammen bewirkt, wurde das amplifizierte *pbp2b* aus *S. oralis* Uo5 in den Stamm O(2x)8 transformiert, der ein rekombinantes *pbp2x* nach Transformation eines *pbp2x*-PCR-Produkts enthält. Somit sollte sichergestellt werden, dass in den erhaltenen Stämmen ausschließlich diese beiden PBPs modifiziert sind. Auf der 0,02 mg/ml Selektionsplatte war ein Bakterienrasen zu vermerken; die Selektion auf 0,03-0,06 µg/ml Piperacillin lieferte etwa die gleiche Anzahl an Transformanten (zw. 20 und 32), während ohne DNA keine Kolonien erhalten wurden. Zur weiteren Analyse wurden insgesamt 12 Kolonien gepickt, je drei von den Platten mit 0,03-0,06 µg/ml Piperacillin. Alle Transformanten besaßen ein niederaffines PBP2b, wobei keine

offensichtlichen Unterschiede zwischen den Transformanten bestanden, die auf verschiedenen Konzentrationen gepickt worden waren (Abb. 3.14).



Abb. 3.14: PBP-Profile der OP-Transformanten

Je 5 µl Zelllysat wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>TM</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7, 5 %iges SDS-Gel (0,275 % BAA, s. 2.8.2) aufgetragen. Die PBP-Bocillin-Komplexe wurden nach ihrer Auftrennung mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde *S. pneumoniae* R6 verwendet. OP(2x/2b)1-3 wurden bei einer Konzentration 0,03 µg/ml Piperacillin gepickt, OP(2x/2b)4-6 bei 0,04 µg/ml, OP(2x/2b)7-9 bei von 0,05 µg/ml und OP(2x/2b)10-12 bei 0,06 µg/ml.

Die Transformante OP(2x/2b)3 wurde willkürlich für weitere detaillierte Analysen ausgewählt. Zunächst jedoch wurde durch Sequenzierung überprüft, wie groß der ausgetauschte Bereich von PBP2b in diesem Stamm ist. Rekombiniert hat nur eine kleine Region von *pbp2b* zwischen den Basen 1261 und 1350. Auf Aminosäure-Ebene resultierte der rekombinierte Bereich in insgesamt 5 Mutationen, die die T<sub>446</sub>A-Mutation einschloss (s. Abb. 3.15).



Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Rekombinationsstellen von *pbp2b* in den Transformanten P(2b) und OP(2x/2b)

Die PBP2b-Proteine der Transformanten P(2b) und OP(2x/2b), sowie der Ausgangsstämme *S. p.* R6 und *S. o.* Uo5 sind als Balken dargestellt. Die Mosaikstruktur von PBP2b aus *S. o.* Uo5 ist schwarz eingezeichnet und unterscheidet sich in etwa 24 % von der *pbp2b*-Sequenz aus *S. p.* R6. Dreiecke zeigen die Lage der drei konservierten Motive in der Transpeptidase-Domäne (rot gestrichelt) an. Bereiche aus *S. o.* Uo5 *pbp2b*, die in den Transformanten übertragen wurden, sind als schwarze Blöcke dargestellt, wobei die Grenzen dieser Bereiche in Basen angegeben sind. Der rot eingegrenzte Bereich in der Transpeptidase-Domäne, der die rekombinierte Bereiche enthält, ist unten als Alignment der Proteinsequenz der vier gezeigten Stämme angegeben. Punkte bedeuten, die Position ist identisch zur R6-Sequenz.

S.p.: S. pneumonie; S. o.: S. oralis

Der Austausch des Bereichs um das konservierte SSN-Motiv hebt nochmal die Bedeutung der T<sub>446</sub>A-Substitution für die  $\beta$ -Laktam-Resistenz hervor und bestätigt die in der Literatur beschriebenen Daten, dass diese einzelne Mutation drastisch die Affinität von PBP2b zu  $\beta$ -Laktamen reduziert.

Um vergleichen zu können, welchen Einfluss beide primäre Resistenzdeterminanten PBP2x und PBP2b alleine und zusammen auf den Resistenzanstieg ausüben, wurde im Folgenden
die MHK der entsprechenden Transformanten für die  $\beta$ -Laktame Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin getestet (Tab. 3.13).

Stamm	Cefotaxim [µg/ml]	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]
O(2x)	0,2	0,02	0,4
P(2b)	0,02	0,05	0,07
OP(2x/2b)	0,2-0,3	1-1,5	3-3,5
S. p. R6	0,01	0,01	0,07

	Tab.	3.13:	MHK-Vergleich	der Transformante	n mit Mosaik-PBP2	k und/oder - PBP2b
--	------	-------	---------------	-------------------	-------------------	--------------------

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der PBP2b- bzw. PBP2x-Transformanten und des Ausgangsstammes R6. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Die MHK Bestimmung wurde mindestens zweimal durchgeführt.

Wie in der Literatur beschrieben, bewirken Modifikationen in PBP2x oder PBP2b einen geringen Anstieg der  $\beta$ -Laktam-Resistenz. Die deutlichste Erhöhung der Resistenz durch den Transfer des modifizierten PBP2b beobachtet man bei der Piperacillin-Resistenz (5-facher Anstieg). Der Transfer des Mosaik-PBP2x bewirkt den deutlichsten Anstieg in der Cefotaxim-Resistenz (20-fache Erhöhung im Vergleich zum R6), führt aber auch zu einer ca. 6-fachen Erhöhung der Oxacillin-MHK. Die gleichzeitige Modifikation der beiden primären Resistenzdeterminanten PBP2x und PBP2b führt zu einem erheblichen Anstieg der  $\beta$ -Laktam-Resistenz. Dabei beobachtet man eine 20- bis 30-fache Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz und einen 43- bis 50-fachen Anstieg der Resistenz gegenüber Oxacillin. Der gleichzeitige Austausch beider Gene jedoch bewirkt den deutlichsten Anstieg bei der Piperacillin-Resistenz. Hier ist eine 100- bis 150-fache Erhöhung zu verzeichnen.

#### 3.5 *murE* und die $\beta$ -Laktam-Resistenz

#### 3.5.1 DNA-Microarray der Transformante P20

In Kapitel 3.2 wurde die Transformante P20 mit ausgetauschtem PBP2x beschrieben. Die hohe MHK-Werte dieser Transformante (Tab. 3.9) sprechen für den Austausch weiterer Gene in diesem Stamm. Um feststellen zu können, welche anderen Gene außer *pbp2x* in die Transformante P20 übertragen wurden und um potentielle andere Nicht-PBP-Resistenzdeterminanten zu entdecken, wurde eine Hybridisierung genomischer DNA auf einem R6-basierten-Microarray der Transformante P20 im Vergleich zum Wildtyp R6 durchgeführt (s. 2.11). Es wurde davon ausgegangen, dass rekombinierte Uo5-Gene wesentlich schlechter hybridisieren als die R6-Gene. Dabei wurde ein Verhältnis von 0,5 als Schwellenwert für den Austausch eines Gens verwendet. Unter diesen Bedingungen konnten drei Gene als ausgetauscht identifiziert werden, *mraY*, das Gen downstream von *pbp2x*, und zwei Gene, *spr1385* und *spr1387*, die für hypothetische Proteine kodieren (s. Tab. 3.14).

Locus Tag	Ratio	Gen	Produkt
spr0305	0,16	mraY	Undecaprenyl-phosphate-UDP-MurNAc-pentapeptide phospho-
			MurNAc-pentapeptide transferase
spr1385	0,26		Hypothetical protein
spr1387	0,08		Hypothetical protein
2349.2x	6,96	pbpX	Penicillin-binding protein 2x S.p. 2349

Tab. 3.14: Signifikante Gene der DNA-Microarray-Analyse von S.p. R6 – P20 auf R6/TIGR-Chip

MraY katalysiert die Translokation des Phospho-MurNAc-Pentapeptides von seinem cytoplasmatischen Akzeptor auf Lipid I (Bouhss et al., 2008). Dieses Gen konnte vorher schon als Resistenzdeterminante ausgeschlossen werden (s. Tab. 3.9 und Abb. 3.7). Das pbp2x (spr0304) ist nicht unter den signifikanten Genen aufgelistet. Der Grund dafür ist, dass das spr0304-spezifische Oligonukleotid sich im vorderen Teil von pbp2x befindet, welches in der Transformante nicht ausgetauscht ist. An ein Oligo hat nur DNA der Transformante gebunden (Ratio = 6,96). Dieses Oligo beinhaltet 70 Basen von pbp2x aus dem Stamm S. pneumoniae 2349, die zu den entsprechenden 70 Basen von pbp2x aus Uo5 identisch sind. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein klinisches Isolat aus Spanien, ein Vertreter des weitverbreiteten hoch-Penicillin- und multiresistenten 23F-Klones. Der 1992 isolierte Stamm weist Mosaikstrukturen in pbp1a, 2b und 2x auf, was für seine hohe Resistenz verantwortlich ist (Reichmann et al., 1997). Wie Abb. 3.6 zeigt, ist PBP2x aus Uo5 bis auf vier Aminosäuren identisch zu dem PBP2x aus S. pneumoniae 2349. Über die Funktion der zwei weiteren ausgetauschten Gene, die für hypothetische Peptide kodieren, liegen keine Informationen vor. Beide Gene sind jedoch sehr kurz und liegen nah aneinander, was vermuten lässt, dass das dazwischenliegende Gen spr1386 ebenfalls ausgetauscht sein könnte und möglicherweise in diesem Bereich sogar mehrere Gene übertragen wurden (Abb. 3.16). Die Betrachtung dieses Bereiches zeigte, dass vor dem übertragenen Gen spr1385 das Gen murE liegt. MurE (UDP-N-Acetylmuramyl-Tripeptid-Synthase) ist ein Enzym, involviert in die Zellwandbiosynthese, welches in Gram-positiven Organismen L-Lysin an die wachsenden UDP-N-Acetylmuramyl-Dipeptid unter ATP-Verbrauch anhängt (Zoeibly et al., 2003).



Abb. 3.16: Abschnitt der genetischen Organisation der Gene *spr1383 spr1387* in *S. pneumoniae* R6

Dargestellt sind die Gene *spr1383-spr1387* aus *S. pneumoniae* R6. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt, grüne Boxen stellen die 70 mer-Oligos dar, die auf dem R6/TIGR-Chip vorhanden sind.

Da die Zellwand-Biosynthese der Angriffsort von  $\beta$ -Laktamantibiotika ist, war hier von Interesse, ob möglicherweise *murE* in der Transformante ebenfalls übertragen wurde und mit der beobachtete Resistenzerhöhung in Zusammenhang stand. Mur-Enzyme, wie MurM, wurden schon in Verbindung mit  $\beta$ -Laktam-Resistenz gebracht. Mosaik-Strukturen von *murM* wurden in klinischen Isolaten beschrieben. Außerdem konnte einen Verlust der Penicillin-Resistenz in Stämmen mit inaktiviertem MurM beobachtet werden (Filipe *et al.*, 2000, Filipe und Tomasz, 2000, Smith und Klugmann, 2001, Weber *et al.*, 2000). Das *murE*-Gen wurde ebenfalls in Verbindung mit  $\beta$ -Laktam-Resistenz beschrieben. Eine Unterbrechung dieses Genes durch eine Transposon-Insertion führte zu einem Abfall der  $\beta$ -Laktam-Resistenz in *Staphylococcus aureus*-Mutanten (Gardete *et al.*, 2004, Ludovice *et al.*, 1998).

## 3.5.2 Sequenzierung von *murE* in P20 und Bestimmung der Rekombinationsstellen

Eine DNA-Sequenzierung zeigte, dass in dem Stamm P20 neben *spr1385* und *spr1387* zusätzlich *spr1386* und das komplette *murE* ausgetauscht war (Abb. 3.17).



Abb. 3.17: Rekombinationsstellen von murE aus S. oralis Uo5 in P20

Dargestellt ist schematisch die genetische Organisation von *murE* aus *S. pneumoniae* R6. Gene sind als graue Pfeile dargestellt. Die Bereiche um *murE* in der P20-Transformante sind unten dargestellt, wobei weiße Blöcke Sequenzabschnitten aus *S. pneumoniae* R6 entsprechen und schwarze aus *S. oralis* Uo5. Die Grenzen der ausgetauschten Bereiche sind als Entfernung von der ersten Base von *murE* angegeben, die als 1 definiert wurde.

In der Transformante P20 hatten neben dem kompletten *murE* und die zur *spr1385* und *spr1386* entsprechenden Gene aus *S. oralis* Uo5 auch Teile von *spr1387* (hypothetisches Protein) und des upstream vom *murE* gelegenen Polysaccharid-Transporter (PST-Transporter) rekombiniert. Der Grund für die bei der Microarray-Analyse nicht erfassten Gene liegt in der Sequenz der entsprechenden Oligonukleotide, die sich nicht ausreichend zwischen R6 und Uo5-Sequenz unterscheiden bzw. in den Bereichen liegen, die nicht rekombiniert haben. (Abb 3.16).

Da jedoch von allen hier rekombinierten Genen, eine Verbindung zwischen *murE* und der beobachteten Resistenzerhöhung am wahrscheinlichsten erschien, rückte *murE* in den Mittelpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

#### 3.5.3 Austausche in *murE* in den P-Transformanten

Aufgrund der Tatsache, dass *murE* in der resistenten P20-Transformante ausgetauscht war und mit Piperacillin selektioniert wurde, stellte sich die Frage, ob die anderen P-Transformanten P1-P19 ebenfalls dieses Gen ausgetauscht haben. Alle wiesen leicht erhöhte MHK-Werte auf (dreifach für Cefotaxim und Piperacillin) im Vergleich zum R6 (s. Tab. 3.6), zeigten aber keine sichtbaren Veränderungen in den PBP-Genen (s. Abb. 3.4). Aus diesem Grund wurde in drei zufällig ausgewählten P-Transformanten P2, P5 und P15 *murE* sequenziert (Abb. 3.18).



Abb. 3.18: Sequenzvergleich von *murE* in ausgewählten P Transformanten, S. *pneumoniae* R6 und S. *oralis* Uo5

Dargestellt ist schematisch das *murE*-Gen in verschiedenen P-Transformanten. Weiße Blöcke entsprechen Sequenzabschnitten aus *S. pneumoniae* R6 und blaue aus *S. oralis* Uo5. Zahlen geben die Basen an, bei denen die ausgetauschten Uo5-Bereiche enden.

Deutlich zu sehen ist, dass die Transformanten P20 und P15 das komplette Gen aus *S. oralis* Uo5 besitzen, die Transformante P5 zeigt nur in der ersten N-terminalen Hälfte Uo5-Sequenz und die Transformante P2 besitzt den kleinsten Uo5-Block, die ersten N-terminalen 240 Basen. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass MurE aus *S. oralis* Uo5 eine Rolle in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz spielt. Zudem lassen diese Ergebnisse zusammen mit den  $\beta$ -Laktam-MHK-Werten dieser Transformanten (s. Tab. 3.6) vermuten, dass der N-terminale Bereich des Gens, v.a. die ersten 240 Basen, nicht nur wichtig, sondern sogar ausreichend für die beobachtete Resistenzerhöhung ist. Ausschließen ließ sich durch dieses Experiment außerdem die Beteiligung der drei hypothetischen Proteine *spr1385-spr1387* an der  $\beta$ -Laktam-Resistenz.

Die Mosaikstruktur von *murE* aus *S. oralis* Uo5 unterscheidet sich auf DNA-Ebene in etwa 13 % und 7,5 % auf Aminosäure-Ebene von der *S. pneumoniae* R6-Sequenz (Abb. 3.19). Die Veränderungen erstrecken sich über die gesamte Länge des Proteins.

```
80
R6
  MIKIETVLDI LKKDGLFREI IDQGHYHYNY SKVIFDSISY DSRKVTEDTL FFAKGAAFKK EYLLSAITQG LAWYVAEKDY
Uo5
   81
                                                     160
R6
  EVDIPVIIVN DIKKAMSLIA MEFYGNPQEK LKLLAFT<mark>GTK GKT</mark>TATYFAY NILSQGHRPA MLSTMNTTLD GETFFKSALT
Uo5
  ..G..... H...RYPT. L......SFS
   161
                                                     240
  TPESIDLFDM MNQAVQNDRT HLIMEVSSQA YLVHRVYGLT FDVGVFLNIT PDHIGPIEHP SFEDYFYHKR LLMENSRAVI
R6
Uo5
   241
                                                     320
  INSDMDHFSV LKEQVEDQDH DFYGSQFDNQ IENSKAFSFS ATGKLAGDYD IQLIGNFNQE NAVAAGLACL RLGASLEDIK
R6
Uo5
   321
                                                     400
  KGIAATRVPG RMEVLTQKNG AKVFIDYAHN GDSLKKLINV VETHQTGKIA LVLGSTGNKG ESRRKDFGLL LNQHPEIQVF
R6
Uo5
   .....S. .....I.
   401
                                                     480
R6 LTADDPNYED PMAIADEISS YINHPVEKIA DRQEAIKAAM AITNHELDAV IIAGKGADCY QIIQGKKESY PGDTAVAENY
Uo5
  481
R6
  T.
Uo5
```

#### Abb. 3.19: Proteinvergleich von MurE aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Gezeigt ist die Proteinsequenz von *murE* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5. Zur R6-Sequenz identische Aminosäure-Positionen sind als Punkte dargestellt. In der Mur-Ligase-Familie konservierten Aminosäuren sind rot eingezeichnet. Gelb hinterlegt ist das ATP-Binde-Motiv.

Die Kristallstruktur von MurE aus *E. coli* ist bekannt. Das Protein besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen Domäne von AS 1-88; einer zentralen, ATP-Binde-Domäne (AS 90-338) und der C-terminalen Domäne (AS 340-497) (Gordon *et al.*, 2001). Das Produkt, UDP-NAc-Tripeptid, bindet in der Spalte zwischen den drei Domänen. Sequenzvergleiche der Mur-Ligase-Familie (MurC bis MurF) zeigten das Vorhandensein von konservierten Aminosäuren, die sich über die gesamte Länge des Proteins verteilen (Gordon *et al.*, 2001, Bouhss *et al.*, 1997, Bouhss *et al.*, 1999). Drei davon befinden sich in dem ATP-Binde-Motiv GXXGKT, und im Falle von MurE aus *S. pneumoniae* entsprechen sie G118, G121 und K122. Die anderen konservierten Aminosäuren sind, im *S. pneumoniae* MurE als Referenz, D41, E185, H213, N298, N301, R331 und D346. Die gerichtete Mutagenese der zu in *S. pneumoniae* MurE K122, E185 und D346 entsprechenden Aminosäuren in MurC und MurD aus *E. coli* zeigte, dass diese Aminosäuren essentiell für den katalytischen Prozess sind. Die in *E. coli* MurC und MurD entsprechenden Aminosäuren zu den K122, H213, N298, N301 und R331 in *S. pneumoniae* MurE wurden beschrieben als wichtig für die Bindung zum Substrat, sowie involviert in der Struktur der "active site" (Bouhss *et al.*, 1997, Bouhss *et al.*, 1999).

Der kürzeste ausgetauschte Block, der bei der Transformante P2 beobachtet wurde, enthält vier Aminosäure-Austausche:  $K_{32}E$ ,  $I_{34}V$ ,  $T_{46}K$  und  $D_{48}R$  in der N-terminalen Domäne. Dies lässt vermuten, dass diese vier Aminosäuren essentiell und gleichzeitig ausreichend sind für den Resistenzanstieg.

#### 3.5.4 Beitrag von *murE* in der β-Laktam-Resistenz

Um den Beitrag von *murE* aus *S. oralis* Uo5 in der  $\beta$ -Laktam-Resistenzentwicklung zu bestätigen, wurden zwei Transformationsexperimente geplant. Im Falle einer Resistenzerhöhung durch *murE* sollte dessen Übertragung in *S. pneumoniae* R6 zur Selektion von Transformanten führen, die das Resistenzpotential der P-Transformanten erreichen. Zudem sollte der Transfer von *pbp2x* in den zuvor erhaltenen R6*murE*-Transformanten die Selektion von Transformanten erlauben, deren MHK-Werte für  $\beta$ -Laktame vergleichbar mit denen der P20-Transformante sind.

#### 3.5.4.1 Vorversuch zum Überprüfen der *murE*-vermittelten β-Laktam-Resistenz

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, in dem zum einen ein *murE*-Amplifikat aus P20 (in dem die komplette *S. oralis* Uo5 *murE*-Sequenz vorliegt) und zum anderen ein *murE*-Amplifikat aus P2 (erste 240 Basen von *murE* sind *S. oralis* Uo5-Sequenz) in O4 bzw. O(2x)8 transformiert wurden. Durch dieses Experiment sollte überprüft werden, ob *murE* an der Resistenz beteiligt ist und ob die ersten 240 Basen dieses Genes für einen Resistenzanstieg ausreichend sind. Die erhaltenen Transformanten sollten eine MHK aufweisen, die im gleichen Bereich liegt, wie der der Transformante P20. Durch Selektion auf Blutagarplatten mit Piperacillinkonzentrationen von 0,015 bis 0,04 µg/ml konnten Transformanten erhalten werden, welche das Resistenzpotential von P20 erreichten. Die Sequenzanalysen von *murE* in diesen Transformanten bestätigte den Austausch von *murE*. In den meisten erhaltenen Stämmen war das komplette zur Transformation eingesetzte Fragment (volle Länge *murE* oder *murE*\* mit 1-240 bp Austausch in der Gensequenz) vorhanden. Zwei der erhaltenen Transformanten allerdings, die relevant für die nachfolgende Arbeit waren, besaßen von den anderen Transformanten abweichende *murE*-Fragmente.

Eine der Transformanten besaß den kürzesten Austausch in der *murE*-Sequenz (1-123 bp) mit zwei Austauschen auf Aminosäure-Ebene:  $K_{32}E$  und  $I_{34}V$ , bezeichnet später als *murE*\*\*. Dies wurde so interpretiert, dass schon diese zwei Mutationen ausreichend für den Resistenzanstieg durch *murE* sind.

Die zweite auffällige Transformante zeigte einen Austausch in dem mittleren Bereich von *murE* (160-1230 bp, bezeichnet später als *murE*<sup>MS</sup>, wobei MS für mittleres Sequenzstück steht). Diese Transformante ist in sofern einzigartig, da alle bis zu diesem Zeitpunkt erhaltenen *murE*-Transformanten einen Austausch in der N-terminalen Region zeigten. Betrachtet man die Sequenz dieser Transformante auf Aminosäure-Ebene, fällt auf, dass die zuvor beobachteten Mutationen K<sub>32</sub>E, I<sub>34</sub>V, T<sub>46</sub>K und D<sub>48</sub>R, die als essentiell für den Resistenzanstieg angesehen wurden, nicht vorkommen. Demnach ließ sich der Resistenzphänotyp dieser Transformante zunächst auf zwei Weisen erklären: Der mittlere

ausgetauschte Block von *murE* trägt, ebenso wie der N-terminale Teil, zur Resistenzanstieg bei. Möglich wäre aber auch die Selektion von resistenzrelevanten Mutationen in anderen Genen.

#### 3.5.4.2 Transfer von amplifiziertem murE in S. pneumoniae R6

Um zu überprüfen, welches Resistenzpotential *murE* alleine besitzt und um sicherzustellen, dass der Resistenzanstieg in den P-Transformanten auf *murE* zurückzuführen ist, wurde eine Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit amplifizierten *murE*-Fragmenten durchgeführt. Durch die folgende Transformation sollte ebenfalls überprüft werden, welche Bereiche von *murE* (die ersten 123 Basen, die ersten 240 Basen oder die komplette Sequenz von *murE*) einen Resistenzanstieg im R6-Background bewirken. Zu diesem Zweck wurden drei Transformationsansätze mit verschiedenen *murE*-Amplifikaten durchgeführt



### Abb. 3.20: Unterschiedliche *murE*-Fragmente, die zur Transformation von *S. p.* R6 eingesetzt wurden

Gezeigt sind schematisch die PCR-Fragmente, die für die durchgeführten Transformationen verwendet wurden. Die drei unterschiedlichen MurE-Fragmente mit jeweils ca. 1000 bp flankierenden Bereichen wurden in *S. pneumoniae* R6 unter Piperacillin-Selektion transformiert. Blaue Bereiche stellen hierbei Sequenzabschnitte aus *S. oralis* Uo5 dar, weiße aus *S. pneumoniae* R6.

Das komplette Mosaik-MurE aus *S. oralis* Uo5, *murE*\*, welches die ersten 240 Basen aus Uo5 enthält, und *murE*\*\* (Base 1-123 der Uo5-Sequenz) mit ca. 1000 bp flankierende Bereiche wurden mit den Primern PM170/171 amplifiziert. Die aufgereinigte 3804 bp-große PCR-Fragmente wurden in R6 unter Piperacillin Selektion transformiert. Die ausgewählten Selektionskonzentrationen waren von 0,01 bis 0,03 µg/ml (in 0,005er Schritte).

	Piperacillin [µg/ml]	Transformanten [cfu/ml]	Transformations -effizienz [%]	Negativ- kontrolle [cfu/ml]
P(murE)	0,01	8x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>-1</sup>	5,97x10 <sup>3</sup>
	0,015	4,82x10 <sup>3</sup>	0,96x10 <sup>-1</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>
	0,02	1,88x10 <sup>3</sup>	0,38x10 <sup>-1</sup>	9x10
P(murE*)	0,01	9,76x10 <sup>3</sup>	1,22x10 <sup>-1</sup>	5,97x10 <sup>3</sup>
	0,015	4,12x10 <sup>3</sup>	0,52x10 <sup>-1</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>
	0,02	1,83x10 <sup>3</sup>	0,23x10 <sup>-1</sup>	9x10
P(murE**)	0,01	1,07x10 <sup>4</sup>	1,33x10 <sup>-1</sup>	5,97x10 <sup>3</sup>
	0,015	4,79x10 <sup>3</sup>	0,6x10 <sup>-1</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>
	0,02	2,38x10 <sup>3</sup>	0,3x10 <sup>-1</sup>	9x10

Tab. 3.15: Selektion d	er P(murE), P(murE*)	) und P(murE**	)-Transformanten

Aufgeführt sind die erhaltenen Ergebnisse bei der Herstellung der MurE-Transformanten. Die Piperacillin-Selektionskonzentrationen und die dabei aus dem Transformationsansatz bzw. der Negativkontrolle jeweils hervorgegangene Anzahl an Kolonien sind aufgelistet. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert. cfu: colony forming units

Bei allen drei Transformationen und mit allen eingesetzten Konzentrationen konnten Transformanten erhalten werden bei einem guten Verhältnis von Kolonien des Transformationsansatzes zu Kolonien auf der Negativkontrolle. Das MurE-Gen des Penicillin-resistenten *S. oralis* ist demzufolge in einem sensitiven *S. pneumoniae* selektionierbar. Insgesamt nahm mit steigender Piperacillinkonzentration die Anzahl der Transformanten deutlich ab (Tab. 3.15). Bei der Transformation des kompletten *murE* aus *S. oralis* Uo5 wurden insgesamt 7 Kolonien zur weiteren Untersuchung gewählt, 3 von der 0,015 µg/ml Selektionsplatte und 4 von der 0,02 µg/ml Selektionsplatte. Bei den *murE\* und murE\*\**-Transformationen wurden jeweils 7 Kolonien von der 0,02 µg/ml Selektionsplatte für weitere Analysen gewählt.

Zur Ermittlung des Resistenzniveaus der erhaltenen P(murE)-, P(murE\*)- und P(murE\*\*)-Transformanten wurde die MHK für das Selektionsantibiotikum Piperacillin mittels des Plattenverdünnungstest bestimmt. Der Rezipient R6 wurde als Kontrolle mitgetestet. Alle Transformanten zeigten vier- bis fünffach höhere MHK-Werte für Piperacillin (0,04-0,05  $\mu$ g/ml) als der Rezipient R6 (0,01  $\mu$ g/ml).

Durch Sequenzierung von *murE* in je 4 ausgewählten Transformanten sollte sichergestellt werden, dass das Gen übertragen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 zusammengestellt.

3 Ergebnisse	
--------------	--

Transformante	murE ausgetauscht	ausgetauschte <i>murE</i> -Region [bp]
P(murE)2	-	-
P(murE)4	-	-
P(murE)5	-	-
P(murE)7	+	1-788
P(murE*)1	+	1-240
P(murE*)2	-	-
P(murE*)5	-	-
P(murE*)6	+	1-240
P(murE**)3	-	-
P(murE**)4	+	1-123
P(murE**)5	+	1-123
P(murE**)6	+	1-123

Tab. 3.16:	Austausch von	murE in P(murE)-	, P(murE*)- und	P(murE**)-	Transformanten
------------	---------------	------------------	-----------------	------------	----------------

Uberraschenderweise zeigten sechs aus insgesamt zwölf sequenzierten Transformanten keinen Austausch innerhalb des murE-Strukturgens. Bei den Transformanten P(murE\*\*) besitzen drei einen murE-Sequenzblock aus S. oralis Uo5 und zwar das komplette murE-Fragment, welches zur Transformation eingesetzt wurde (murE 1-123 bp) mit zwei Austauschen auf Aminosäure-Ebene: K<sub>32</sub>E und I<sub>34</sub>V. Dies stimmt immerhin mit der Vermutung überein, dass schon diese zwei Mutationen ausreichend für den Resistenzanstieg durch murE sind. Bei den Transformanten P(murE\*) konnte nur bei zwei ein murE-Austausch nachgewiesen werden. In den P(murE)-Transformanten besitzt nur eine Transformante, P(murE)7, ein MurE-Fragment aus Uo5. Dieser Stamm beinhaltet einen Uo5-Sequenzabschnitt in der N-terminalen Region (1-788 bp). Die sechs Transformanten ohne Austausch in dem murE Gen jedoch stehen im Widerspruch zu der bis zu diesem Zeitpunkt vermuteten Resistenzerhöhung durch murE. Möglich wäre, dass durch die β-Laktam-Selektion bei diesen Transformanten Mutationen in Genen aufgetreten sind, die zu einem Resistenzanstieg führen. Eine andere Erklärung wäre, dass nicht die Mutationen in der kodierenden Sequenz von murE den Resistenzanstieg bewirken, sondern Mutationen in den flankierenden Bereichen, und genauer gesagt in der upstream Region von murE.

#### 3.5.5 Sequenzanalyse der Promotorregion von murE

In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten erhaltenen *murE*-Transformanten die Nterminale Region des Gens ausgetauscht haben, wurden die Transformanten einer weiteren Sequenzanalyse unterzogen, wobei jetzt der Promotorbereich von *murE* mit einbezogen wurde. Die *murE*-Promotorregionen von *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 unterscheiden sich deutlich (Abb. 3.21).



Abb. 3.21: Vergleich der Promotorregion von murE aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Dargestellt ist das Alignment der Promotorregion von *murE* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5. Die -35-Region ist grün hinterlegt, die -10-Region lila. Der Anfang von *murE* ist rot unterlegt. Nur Basen, die von der R6-Sequenz abweichen, sind in der Uo5-Sequenz gezeigt; zur R6-Sequenz identische Nukleotide sind als Punkte dargestellt.

Die Promotorregion von *murE* aus *S. oralis* Uo5 zeigt acht Nukleotidabweichungen zur Promotorregion aus R6. Eine davon befindet sich direkt in der -10-Box, die restlichen sind zwischen der -35 und -10-Region zu finden. Im Folgenden war von Interesse, ob in den Transformanten mit oder ohne Austausch in *murE* (3.5.3 und 3.5.4.2) ebenfalls der Promotorbereich ausgetauscht war. Dazu wurde die Promotorregion in einigen der Transformanten mit Austausch in dem *murE* Gen, sowie alle in 3.5.4.2 beschriebenen Transformanten ohne *murE*-Austausch mit dem Primer PM279 sequenziert. Die Sequenzanalyse und Alignment zeigte, dass alle sequenzierten Stämmen upstream von *murE* Sequenzblöcke aus *S. oralis* Uo5 besaßen, wobei der kleinste Block nur die Austausche in der Promotorregion beinhaltete und der größte sich über die 985 Basen stromabwärts von *murE* erstreckte. Dieses Ergebnis gab erste Hinweise darauf, dass die beobachtete Resistenz auf die Mutationen in der Promotorregion von *murE* zurückzuführen ist und nicht wie bis zu diesem Zeitpunkt vermutet, auf Austausche im N-terminalen Bereich von MurE.

#### 3.5.6 Aktivität der murE- Promotoren aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Durch die Sequenzanalyse in 3.5.5 konnte gezeigt werden, dass in den Transformanten die *murE*-Promotorregion ausgetauscht war. Somit war von Interesse zu erfahren, ob und wenn ja, wie sich diese Veränderungen in dieser Region auf die Aktivität des Promotors auswirken. Die Aktivität der *murE*-Promotoren aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 sollte im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay (s. Kap. 2.9) unter Verwendung der in das integrative Promotor-Probe-Plasmid pPP2 klonierten Promotorfragmente bestimmt und untereinander verglichen werden.

Zur Herstellung der im β-Galaktosidase-Assay benötigten pPP2-Promotor-*lacZ*-Fusionen wurden die entsprechenden Promotorregionen (s. Abb. 3.21) zunächst unter Verwendung der Primer PM275 und PM276 in einer PCR amplifiziert. Die amplifizierten Promotorregionen wurden nach einer Restriktion mit *SphI* und *BamHI* mit gleichfalls *SphI/BamHI*- verdautem pPP2 ligiert und in *S. pneumoniae* R6 transformiert. Die Selektion erfolgte auf 3 µg/mI Tetracyclin. Die Inserts sowie die Integration der jeweiligen pPP2-Derivaten wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer 274\_lac und MCS\_forw\_Kontr sowie EII\_forw\_Kontr und

bgaA\_rev\_Kontr überprüft. Für den Assay wurden je zwei Transformanten ausgewählt. Die so hergestellten Promotor-Probe-Stämme R6\_ $P_{murER6}$ -1 und -2 und R6\_ $P_{murEUo5}$  -1 und -2 wurden in dem folgenden  $\beta$ -Galaktosidase-Assay zur Bestimmung der Promotoraktivität eingesetzt.

Die Durchführung des β-Galaktosidase-Assays erfolgte wie in 2.9.2 beschrieben. Die Kulturen wurden in C-Medium bis zu einer Zelldichte von N=80 bzw. bis zwei Stunden nach Erreichen der stationären Phase angezogen und je 2 ml der Kulturen zur Bestimmung der Promotoraktivitäten gemäß 2.9.2 verwendet. In Abbildung 3.22 sind die so bestimmten Aktivitäten der *murE*-Promotoren aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 graphisch dargestellt.



Abb. 3.22: Promotoraktivität der murE-Promotoren aus S. pneumoniae R6 und S. oralis Uo5

Dargestellt sind die Aktivitäten der *murE*-Promotoren aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 als β-Galaktosidase-Units [nmol freigesetztes ONP/(min\*mg Protein)]. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten von je zwei Klonen sind gezeigt. Alle Assays wurden in C-Medium bei einer Zelldichte von N=80 (A) sowie in der stationären Phase (B) durchgeführt.

Deutlich zu erkennen ist, dass der Uo5 murE-Promotor eine stärkere Aktivität als der R6 murE-Promotor aufweist. Bei einer Zelldichte von N=80 wurden für den murE-R6-Promotor Werte von ca. 40 ß-Galaktosidase-Units gemessen. Dagegen zeigten die Stämme mit dem Uo5-Promotor eine 2- bis 2,5-fach stärkere Aktivität mit 80 bis 100 gemessene β-Galaktosidase-Units. In der stationären Phase konnte ebenfalls eine stärkere Promotoraktivität von Uo5-murE-Promotor nachgewiesen werden. Während die für die Stämme mit R6-Promotor-Probe-Fusion Aktivität bei 72 bis 75 Units liegt, zeigt der Uo5-Promotor eine Aktivität von 130 bis 200 Units. Bei dem Stamm R6<sub>PmurER6</sub>-1 wurde bei der ersten Messung eine viel höhere Aktivität im Vergleich zu der zweiten Messung und zu den ermittelten Werten der zweiten Transformante gemessen. Dieser hohe Wert ist auf die niedrige gemessene Proteinkonzentration zurückzuführen und wurde hier als Fehler interpretiert. Die Mutationen in der Promotorregion von murE aus S. oralis Uo5 haben also offenbar eine positive Auswirkung auf die Promotoraktivität. Die stärkere Expression des Genes könnte in Zusammenhang mit der Resistenzerhöhung stehen.

#### 3.5.7 Herstellung einer ektopischen *murE*-Kopie mit unterschiedlichen Promotor-Gen-Fusionskonstrukten

Die in 3.5.4.2 beschriebenen Transformanten mit erhöhter β-Laktam-Resistenz zeigten Austausche in der murE-Sequenz und/oder in der Promotorregion von murE. Um überprüfen zu können, ob die Mutationen in der Gensequenz, oder im Promotorbereich oder sogar in beiden DNA-Sequenzen für den beobachteten Resistenzphänotyp verantwortlich sind, wurden die möglichen vier verschiedenen Kombinationen der Promotorregionen (Uo5 bzw. R6), mit den murE-Strukturgenen (ebenfalls Uo5 bzw. R6) konstruiert, und die Auswirkung auf die Resistenz in dem O(2x)-Stamm untersucht. Dafür war es notwendig, dass das ursprüngliche murE anschließend im R6-Genom deletiert wurde (s. Kap. 2.10). Der Transformationsschritt, der für die Darstellung der murE-Konstrukte notwendig war, sollte ohne β-Laktam-Selektionsdruck erfolgen, um zu verhindern, dass unerwünschte Mutationen, die die β-Laktam-Resistenz ebenfalls beeinflussen könnten, selektioniert werden. Zu diesem Zweck wurden die hergestellten Konstrukte in das integrative Plasmid pSW1 kloniert, das durch Transformation unter Trimethoprim-Selektion in O(2x)8 in den Lokus zwischen bgaA und spr0568 eingebracht wurde. O(2x)8 wurde als Rezipient gewählt, da der murEvermittelte MHK-Anstieg in Gegenwart des Uo5 pbp2x offenbar deutlicher zu erkennen ist. Zudem war dieser Stamm durch Transformation mit gereinigtem pbp2x PCR-Produkt hergestellt worden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass hier keine weiteren Gene verändert vorliegen. Nach Inaktivierung des R6-murE sollte durch Bestimmung der MHK die Rolle von murE in der β-Laktam-Resistenz überprüft werden. Da murE ein essentielles Gen ist (Thanassi et al., 2002), musste zuerst die Transformation der verschiedenen murE-Konstrukte an einer anderen Stelle in Genom erfolgen, bevor anschließend das ursprüngliche R6-murE inaktiviert wurde.

Das gesamte *murE* mit vorhergesagten Promotor- und Terminatorbereichen wurde mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 2.11) amplifiziert, wobei eine *Nhel*- und eine *BamHI*-Schnittstelle angefügt wurde. Die dabei benutzten Forward-Primer enthielten die zu amplifizierende Promotorregion.

Wie in 2.10 beschrieben, wurden die gewünschten Fragmente aus genomischer *S. pneumoniae* R6 oder *S. oralis* Uo5-DNA amplifiziert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Nach Ligation mit dem zuvor geschnittenen integrativen Plasmid pSW1, wurde der Ligationsansatz in O(2x)8 transformiert, wobei die Selektion auf 15 µg/ml Trimethoprim erfolgte. Nach dem Überprüfen der Transformanten auf das Vorhandensein des Inserts mittels PCR und anschließender Sequenzierung wurde in den

hergestellten Stämmen das Wildtyp-murE mittels der aad9-Kassette inaktiviert (s. 2.10). In den resultierenden Stämmen  $O(2x)UR\Delta murE$ ,  $O(2x)RU\Delta murE$ ,  $O(2x)UU\Delta murE$ O(2x)RRAmurE waren nach erfolgreicher Integration der aad9-Kassette lediglich noch die Kodons für die ersten 4 Aminosäuren des N-Terminus und die Kodons für die letzten 16 Aminosäuren von murE vorhanden. Die aad9-Kassette sollte hierbei in der gleichen Orientierung im Genom wie das zu deletierende Gen murE integriert werden. Unter Verwendung der Primer PM170 und PM271 sowie PM272 und PM171 wurden die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Region in einer PCR aus chromosomaler DNA der Stammes R6 amplifiziert. Hierbei wurde durch die Primer PM271 und PM272 eine BamHI- bzw. eine Nhel-Schnittstelle angefügt. Die aad9-Kassette wurde unter Verwendung der Primer PM273 und PM274 aus genomischer DNA des Stammes S. pneumoniae R6 ciaR::aad9 (Zähner, 1999) amplifiziert, wobei durch die verwendeten Primer eine BamHIund eine Nhel-Schnittstelle angefügt wurde. Nach Restriktion der einzelnen Amplifikate und Ligation aller drei Fragmente wurde der vorher hergestellte Stamm mit zwei murE-Kopien direkt mit dem Ligationsansatz transformiert und auf 80 µg/ml Spectinomycin selektioniert. Das murE-Inaktivierungsderivat wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Ergebnisse der anschließenden MHK-Bestimmung der vier Stämme mit ektopischen murE-Fusionskonstrukte im Vergleich zum Rezipient O(2x)8 und der Transformante P20 sind in Tabelle 3.17 aufgestellt.

Stamm		MHK [µg/ml]		
	Cefotaxim	Piperacillin	Oxacillin	
O(2x)RU∆murE	0,4	0,07	1,5	
O(2x)UR∆murE	0,4	0,07	1,5	
O(2x)RR∆murE	0,3	0,03	0,5	
O(2x)UU∆murE	0,4	0,07	1,5	
O(2x)8	0,2	0,02	0,4	
P20	0,4	0,06	1,5	

 Tab. 3.17: MHK-Werte der Stämme mit ektopischen murE-Promotor-Fusionskonstrukten im Vergleich zum Rezipient O(2x)8 und der Transformante P20

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der Stämme mit ektopischer *murE*-Kopie und der Transformanten O(2x)8 und P20. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er  $\mu$ g/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Die Werte sind Mittelwerte von mindestens zwei MHK Bestimmungen.

Das Ergebnis war eindeutig. Der Austausch von R6-*murE* gegen *S. oralis* Uo5-*murE* ohne Verwendung von  $\beta$ -Laktamen während der Selektion führt zu einem Anstieg der Resistenz für  $\beta$ -Laktame. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Resistenzerhöhung auf Mutationen in anderen Genen zurückzuführen ist.

Beim Vergleich der ermittelten MHK-Werte für  $\beta$ -Laktame fällt auf, dass die Stämme O(2x)UU $\Delta$ murE, O(2x)RU $\Delta$ murE und O(2x)UR $\Delta$ murE, also die Transformanten, die sowohl

Promotorregion und Strukturgen von *murE* aus Uo5, aber auch solche, die nur das Uo5 Strukturgen bzw. die Uo5-*murE*-Promotorregion besitzen, eine Erhöhung der MHK im Vergleich zum Rezipient O(2x)8 zeigen. Diese MHK-Werte haben das Resistenzniveau der Transformante P20 erreicht, welche sowohl den Promotorbereich als auch die Gensequenz von *murE* aus *S. oralis* enthält. Die ermittelten Werte bestätigen die Rolle von *murE* in β-Laktam-Resistenz. Der Stamm O(2x)RRΔmurE dagegen, welcher eine ektopische Kopie von *murE* aus R6 besitzt, zeigt für die getesteten β-Laktame zwar auch leicht erhöhte MHK-Werte im Vergleich zum Rezipienten, die aber deutlich unter denen der anderen Konstrukte lagen. Wahrscheinlich ist dies auf eine Background-Aktivität des Plasmids zurückzuführen ist. Durch diese Ergebnisse lässt sich schließen, dass sowohl der Promotorbereich von *murE* aus *S. oralis* Uo5 als auch die Mosaiksequenz von *murE* einen Einfluss auf die β-Laktam-Resistenz in *S. oralis* ausüben. Die Mutationen in der Promotorregion und das Mosaik-*murE* scheinen im gleichen Ausmaß die Resistenz zu beeinflussen. Ein gleichzeitiger Austausch von Promotor- und Gensequenz erhöht diesen Effekt nicht.

#### 3.5.8 Transfer von *murE<sup>MS</sup>* aus *S. oralis* Uo5

Die im vorgehenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse haben Hinweise geliefert, dass nicht nur die veränderte Promotorregion, sondern auch Teile des Strukturgens *murE* für einen Resistenzanstieg verantwortlich sein können. Aus diesem Grund sollte der Beitrag von *murE* alleine in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz in einer weiteren Transformation überprüft werden. Die in 3.5.4.1 beschriebene Transformante, die neben der Transformante O(2x)RU $\Delta$ murE die einzige ist, in der die *murE*-Promotorregion unverändert vorlag, stellte den Donor für diese Transformation dar: hier ist nur der Bereich von bp 160 bis 1230 *S. oralis* Uo5-Sequenz (Abb. 3.23). Wie im vorigen Kapitel wurde auch hier O(2x)8 als Rezipient ausgewählt.



### Abb. 3.23: Zur Transformation eingesetztes Fragment, das einen zentralen Teil S. oralis Uo5 murE enthält

Gezeigt ist schematisch das PCR-Fragment, das für die durchgeführte Transformation verwendet wurde. Das *murE*-Gen (bp 1-1446) mit jeweils ca. 1000 bp flankierenden Bereichen wurde in dem Stamm O(2x)8 unter Piperacillin-Selektion transformiert. Blaue Bereiche stellen hierbei Sequenzabschnitte aus *S. oralis* Uo5 dar, weiße aus *S. pneumoniae* R6.

Transformanten wurden mit Konzentrationen von 0,015 bis 0,035 µg/ml Piperacillin selektioniert, wobei für die Abstufung 0,005er Schritte gewählt wurden.

Piperacillin	Transformanten	Transformations-	Negativkontrolle
[µg/ml]	[cfu/ml]	effizienz [%]	[cfu/ml]
0,015	2,6x10 <sup>5</sup>	14x10 <sup>-2</sup>	2x10 <sup>5</sup>
0,02	1,6x10 <sup>5</sup>	8,52x10 <sup>-2</sup>	2x10 <sup>4</sup>
0,025	1x10 <sup>5</sup>	5,66x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>3</sup>
0,03	9,9 x10 <sup>4</sup>	5,44x10 <sup>-2</sup>	0
0,035	3,3x10 <sup>2</sup>	1,81x10 <sup>-2</sup>	0

Tab.	3.18:	Selektion de	er OP	(2x/murE <sup>№</sup>	<sup>∕/S</sup> )-T⊧	ransformant	ten
------	-------	--------------	-------	-----------------------	---------------------	-------------	-----

Die erhaltenen Ergebnisse bei der Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit amplifiziertem *murE*<sup>MS</sup> unter Selektion von Piperacillin sind aufgelistet. Es wurden 100 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert.

cfu: colony forming units

Mit allen eingesetzten Konzentrationen konnten Transformanten erhalten werden; ab einer Konzentration von 0,025 µg/ml Piperacillin konnte ein gutes Verhältnis von Kolonien des Transformationsansatzes zu Kolonien auf der Negativkontrolle beobachtet werden. Für die nachfolgende Bestimmung der MHK wurden 10 Transformanten ausgewählt, jeweils 3 von der 0,02 und 0,025 µg/ml Selektionsplatte und 4 von der 0,03 µg/ml Selektionsplatte. Die MHK der Transformanten für das zur Selektion eingesetzte Antibiotikum Piperacillin wurde im Vergleich zum Rezipienten O(2x)8 sowie zu den Stämmen P20, O(2x)RUAmurE und O(2x)UR∆murE bestimmt. Die MHK der letzten drei Stämme sollte die gleiche sein wie die der erhaltenen Transformanten. Da die MHK des Rezipienten bei 0,02 µg/ml und die für die Transformanten erwarteten MHK-Werte bei ca. 0,06 µg/ml Piperacillin lagen, wurden für den Plattenverdünnungstest Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,08 µg/ml Piperacillin ausgewählt. Alle erhaltenen Transformanten zeigten einen MHK-Wert von 0,07 µg/ml Piperacillin, welcher der MHKs der Referenzstämme O(2x)RUAmurE, O(2x)URAmurE und ausgewählten Transformanten  $[OP(2x/murE^{MS})4]$ P20 entsprach. In zwei und OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5] wurde der *murE*-Bereich sequenziert. Die Transformante OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 zeigte einen Austausch von murE von bp 160-690, OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5 enthielt einen murE-Uo5-Sequenzblock von bp 300-1230 (Abb. 3.24).

70 R6 MIKIETVLDI LKKDGLFREI IDQGHYHYNY SKVIFDSISY DSRKVTEDTL FFAKGAAFKK EYLLSAITQG ............ OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5 ............ 71 140 R6 LAWYVAEKDY EVDIPVIIVN DIKKAMSLIA MEFYGNPQEK LK<mark>L</mark>LAFTGTK G<u>KT</u>TA<mark>T</mark>YFAY <mark>N</mark>ILSQ<mark>GHRP</mark>A Uo5  $murE^{MS}$ OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 141 210 R6 MLSTMNTTLD GETFFKS<mark>ALT</mark> TPE<mark>S</mark>IDLFDM M<mark>N</mark>QAVQN<mark>D</mark>RT HL<mark>I</mark>MEVSSQA YLVHRVYGLT FDVGVFLNIT Uo5 <mark>l</mark>......<mark>SFS</mark> ...<mark>N</mark>...... .<mark>A</mark>.....<mark>G</mark>.. ..<mark>V</mark>...... ........  $\texttt{murE}^{\texttt{MS}}$ OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5 211 280 R6 PDHIGPIEHP SFEDYFYHKR LLMENSRAVI INSDMDHFSV LKEQVEDQDH DFYGSQFDNQ IENSKAFSFS .....E. .....SS.. Uo5  $\texttt{murE}^{\texttt{MS}}$ .....E. .....SS.. OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5 281 R6 ATGKLAGDYD IQLIGNFNQE NAVAAGLACL RLGASLEDIK KGIAATRVPG RMEVLTQKNG AKVFIDYAHN Uo5 murE<sup>MS</sup> OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 ..... 351 420 R6 GDSLKKLINV VETHQTGKIA LVLGSTGNKG ESRRKDFGLL LNQHPEIQVF LTADDPNYED PMAIADEISS Uo5 .....S. .....E....  $murE^{MS}$ .....S. .......I. .....I. OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 421 481 R6 YINHPVEKIA DRQEAIKAAM AITNHELDAV IIAGKGADCY QIIQGKKESY PGDTAVAENY L Uo5  $murE^{MS}$ ..... OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4 . . . . . . . . . . ........... OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5 

#### Abb. 3.24: Proteinvergleich von MurE aus den Stämmen OP(2x/murE<sup>MS</sup>)4, OP(2x/murE<sup>MS</sup>)5, *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 und des Fragmentes *murE*<sup>MS</sup>

Gezeigt ist die Proteinsequenz von *murE* in den verschiedenen Stämmen. Zur R6-Sequenz identische Aminosäure-Positionen sind als Punkte dargestellt. Die in allen drei Transformanten vorhandenen Aminosäureaustausche sind gelb unterlegt. Das ATP-Binde-Motiv ist unterstrichen.

Auf Aminosäure-Ebene zeigen die beiden Transformanten unterschiedlich große Mosaik-Bereiche, die nur zum Teil überlappen. Auf DNA-Ebene befindet sich der kleinste gemeinsame Mosaikblock zwischen bp 300 und 687. Die 15 gemeinsamen Aminosäureaustausche sind in Abb. 3.24 gelb dargestellt und erstrecken sich von AS 113 bis AS 183. Diese Veränderungen zeigen sich somit als notwendig für die durch *murE* vermittelte Resistenz.

#### 3.5.9 Sequenzvergleich von murE in anderen Streptokokken

Zur Identifizierung resistenzrelevanter Mutationen in der Promotorregion von *murE* und in der MurE-Proteinsequenz wurden Sequenzvergleiche durchgeführt, für die resistente und

sensitive *S. pneumoniae*- und oralen Streptokokken-Stämme aus der Abteilungsstammsammlung verwendet wurden (Abb. 3.25 und 3.26).

			-35		-	-10	
S.p. R6	ATC TTCCATTA	TA AACTTTTTCCT	TGTTAC <mark>TTGT</mark>	<b>AA</b> ATTTACGA	CTTTCGGTT <mark>T</mark>	ACAAT <mark>AGAAA</mark>	GTATG
S.p. TIGR4							
S.p. Hul7							
S.p. Hu15							
S.p. 670							
S.p. 23F				G			
S.p. PS2677				G			
S.m. 10712			C				
S.m. M3			C				
S.m. B6			C	ACG.G	GAA	.T	
S.o. Uo5				ACG.G	GAA	.T	

Abb. 3.25: Sequenzvergleich der Promotorregion von *murE* in verschiedenen Streptokokken-Isolaten

Gezeigt ist die Promotorregion von *murE* in resistenten und sensitiven Pneumokokken- und Streptokokken-Isolaten. Als Referenz dient die Sequenz des β-Laktam-sensitiven Laborstammes *S. pneumoniae* R6. Die in den Isolaten auftretenden von der Referenzsequenz abweichenden Nukleotide sind durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Eine Übereinstimmung dagegen ist durch Punkte dargestellt. Grün unterlegt ist die -35-Region, lila die -10-Region. S.p.: *S. pneumoniae*, S.m.: *S. mitis*, S.o.: *S. oralis* S. p. 23F: Spain1-<sup>23F</sup>

Die sensitiven *S. pneumoniae*-Stämme TIGR4 und Hu15, und die β-Laktam-resistenten *S. pneumoniae* Hu17 und 670 zeigten keine Veränderungen in der Promotorsequenz von *murE*. Die *S. mitis*-Stämme haben die gleiche T zu C-Mutation, vier Nukleotide vor der -35-Box gemeinsam. Die Promotorregion von *murE* aus dem resistenten *S. mitis* B6 zeigt die größte Ähnlichkeit zu der von *S. oralis* Uo5. Die Isolate mit Serotyp 23F zeigen die gleiche A zu G-Mutation, vier Nukleotide nach der -35-Region. Auch die hochresistenten *S. mitis* B6 und *S. oralis* Uo5 besitzen an der gleichen Stelle eine Mutation, hier allerdings A zu C.

	1						70
S.p. R6	MIKIETVLDI	LKKDGLFREI	IDQGHYHYNY	SKVIFDSISY	DSRKVTEDTL	FFAKGAAFKK	EYLLSAITQG
S.p. Hul7				V			
S.p. Hu15				V			
S.p. TIGR4							
S.p. 23F				V			
S.m. B6				V	K		.F.IS
S.p. 670							
S.p. PS2677				V			
S.o. Uo5				.E.V	K.R		
S.m. 10712		N		.H.VT.C.	AK.KS.	V	.F.IS
S.m. M3				.H.VT.C.	RAK.KS.	V	.F.IS
	<b>D</b> 1						140
	71						140
S.p. R6	71 LAWYVAEKDY	EVDIPVIIVN	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	lkllaft <mark>gtk</mark>	<mark>GKT</mark> TATYFAY	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17	71 LAWYVAEKDY	EVDIPVIIVN	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFT <mark>GTK</mark>	<mark>GKT</mark> TATYFAY 	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15	71 LAWYVAEKDY	EVDIPVIIVN	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFT <mark>GTK</mark> 	<mark>GKT</mark> TATYFAY 	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4	71 LAWYVAEKDY	EVDIPVIIVN	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFT <mark>GTK</mark>	GKT 	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F	71 LAWYVAEKDY	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFT <mark>GTK</mark>	<mark>GKT</mark> TATYFAY A A	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFT <mark>GTK</mark>	GKT A A A	140 NILSQGHRPA
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6 S.p. 670	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFTGTK	GKT A A A A	140 NILSQGHRPA 
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6 S.p. 670 S.p. PS2677	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFTGTK	GKT A A A A A	140 NILSQGHRPA 
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6 S.p. 670 S.p. PS2677 S.o. U05	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFTGTK	GKT ATYFAY AA AA AA AA AA	140 NILSQGHRPA RYPT. RYPT. HRYPT.
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6 S.p. 670 S.p. PS2677 S.o. U05 S.m. 10712	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFTGTK	GKT A, A, A, A, A, A, A, A, A, A, A,	140 NILSQGHRPA 
S.p. R6 S.p. Hu17 S.p. Hu15 S.p. TIGR4 S.p. 23F S.m. B6 S.p. 670 S.p. PS2677 S.o. Uo5 S.m. 10712 S.m. M3	71 LAWYVAEKDY 	EVDIPVIIVN 	DIKKAMSLIA	MEFYGNPQEK	LKLLAFTGTK	GKT AA AA AA AA AA AA AA	140 NILSQGHRPA RYPT. RYPT. RYPT. HRYPT.

	141						210
Sp R6	MI.STMNTTID	GETEEKSALT	TPESIDLEDM	MNOAVONDRT	HLIMEVSSOA	YLVHRVYGLT	FDVGVFLNIT
S n Hu17	1100 11101 100	OBILINOMBI	11 10 1011 011		niiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii	I DAUKAIODI	I D VOVI DIVII
S.p. 11017						N	
S n TICRA					••••••	K	د م
5.p. 11014						D	د م
5.p. 251 9 m B6	т	K GEG	 N	л к С		••••	
з.ш. <u>в</u> о	±		· · · IN · · · · · ·	.AK.G			
5.p. 6/0	L	.TSFS	N	.AK.G.S	•••V••••••	• • • • • • • • • • •	
5.p. P520//	L	.TSFS	N	.AK.G.S			
5.0.005	۰		••••N••••••	.AG	••• <sup>V</sup> ••••••		
5.111. 10/12	• • • • • • • • • • •	· ſ	• • • • • • • • • • •				
5.M. M3	• • • • • • • • • • •	· ħ	• • • • • • • • • • •	.D		· · · ħ · · · · · ·	
	011						200
		0 FFDVFVIIVD	TIMENCOAVE	TNODMDUEQU		DEVCCOEDNO	TENCEARCEC
5.p. Ko	PUNIGPIENP	STEDITIERK	LIMENSKAVI	INSDMDHESV	TVEÕAEDÕDU	DEIGSQEDNQ	TENSKALSLS
S.p. Hul/	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	
S.P. HUIJ	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	
5.p. 11GR4	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	
5.p. 23F		• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
S.m. B6	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			· · · · · · N · · ·		
S.p. 670	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •					
S.p. PS26//	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			•••••		
5.0. 005	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	KV		E.		
S.m. 10/12	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	· • D • • • • • • • •	SN	• • • • • • • • • • •
S.m. M3	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	·····SS	• • • • • • • • • • •
	0.01						250
			NATAACTACT	DICAGIEDIK	VCTAMDUDC		
5.p. Ko	ATGKLAGDID	TÖTTGNENÖF	NAVAAGLACL	REGASEEDIK	KGIAATRVPG	RMEVLTQKNG	AKVELDIAHN
S.p. Hul/		• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •				
S.p. Hulb	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •				
S.p. TIGR4	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.p. 23F	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.m. B6	• • • • • • • • • • •	· · · · · <sup>H</sup> · · · ·	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.p. 670		• • • • • • • • • • •			• • • • • • • • • • •		
S.p. PS2677					• • • • • • • • • • •		
S.o. Uo5		· · · · · H · · · ·			• • • • • • • • • • •		
S.m. 10712		· · · · · H · · · ·	I				I
S.m. M3		· · · · · H · · · ·	S				
	251						400
	351						420
S.p. R6	GDSLKKLINV	VETHQTGKIA	LVLGSTGNKG	ESRRKDFGLL	TNOH DE LOAR.	LTADDPNYED	PMAIADEISS
S.p. Hul/	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.p. Hulb	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.p. TIGR4	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
S.p. 23F	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
S.M. 86	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	••T•••••
S.p. 670		• • • • • • • • • • •			• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
s.p. PS26/7	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • • •		•••••
S.o. Uo5	s.			I.			· · · · · E · · · ·
S.m. 10712							
S.m. M3							
	101					A (	0.1
	4Z1		יילי דייווואיי דיי	TTACKCADOV	OTTOCHUROW	42	)
5.p. K6	TINHLARY	UKQBAIKAAM	ATINHELDAV	TIAGRGADCY	QIIQGKKESY	PGDTAVAENY	Ц
S.p. HUL/							•
S.p. HUIS							•
S.p. TIGK4	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •				•
S.p. 23₽	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		•••••	•
S.m. B6	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			vA.	A	•
S.p. 670	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			• • • • • • • • • • •		•
s.p. PS2677			•••••				•
5.0. U05		E			vD.	A.1C.	•
S.m. 10712			'I'SQ		VA.	A	
S.m. M3	s	<u></u>	SQ		VA.	A	•

#### Abb. 3.26: Vergleich der Proteinsequenz von MurE in verschiedenen Streptokokken

Als Referenz dient die Sequenz des β-Laktam-sensitiven Laborstammes *S. pneumoniae* R6. Die in den Isolaten auftretenden, von der Referenzsequenz abweichenden Aminosäuren sind durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Eine Übereinstimmung dagegen ist durch Punkte dargestellt. In der Mur-Ligase-Familie konservierten Aminosäuren sind rot eingezeichnet. Gelb hinterlegt ist das ATP-Binde-Motiv. Der kleinste gemeinsame Uo5-Sequenzabschnitt, ausgetauscht in den unter 3.5.8 beschriebenen Transformanten, ist blau unterlegt. S.p.: *S. pneumoniae*, S.m.: *S. mitis*, S.o.: *S. oralis* 

Das Alignment der MurE-Proteinsequenz zeigt, dass MurE aus *S. oralis* Uo5 die größte Ähnlichkeit zu MurE aus den *S. mitis*-Isolaten besitzt. Interessanterweise finden sich in den *S. pneumoniae*-Isolaten 670 und PS2677 ebenfalls zu *S. mitis* B6 und *S. oralis* Uo5 sehr ähnliche Sequenzbereiche, die für AS 103-183 kodieren. Dieser Bereich ist der kleinste gemeinsame Sequenzblock aus Uo5, welcher in resistenten Transformanten (s. 3.5.8) ausgetauscht wurde und befindet sich in der zentralen ATP-Binde-Domäne von MurE. Da dieser Bereich so verändert nur in hochresistenten Penicillin-resistenten Stämmen vorkommt, ist das ein Hinweis für potentielle resistenzrelevante Mutationen in dieser Region.

#### 3.5.10 Expression von *pbp2x* in den *murE*-Transformanten

Die Transformationsexperimente mit *murE* aus *S. oralis* Uo5 konnten bestätigen, dass dieses Gen in einem resistenzvermittelnden Mechanismus involviert ist. Einen Hinweis für eine mögliche Erklärung dafür lieferte eine Publikation, in der *murE* aus *S. aureus* als Resistenzfaktor beschrieben war. Eine Überexpression von MurE führte dort zu einer erhöhte Transkriptmenge von *mecA*, das *S. aureus*-spezifische PBP, das verantwortlich für die Methicillin-Resistenz ist, und von *pbpB*, einem hmw PBP (Gardete *et al.*, 2004).

#### 3.5.10.1 Analyse der PBP-Menge mittels Western-Blot

Um zu sehen, ob auch in *S. pneumoniae* das *S. oralis murE* zu einer Expressionsänderung in der PBPs führt, wurde die Menge von PBP1a, 2x und 2b mit Hilfe spezifischer Antikörper in verschiedenen Stämmen auf Western-Blots bestimmt, und mit der des Ausgangsstammes *S. pneumoniae* R6 verglichen.

Hierzu wurden gleiche Mengen an Lysat der Stämme O(2x)URΔmurE, O(2x)RUΔmurE, O(2x)RUΔmurE, O(2x)RRΔmurE auf einer SDS-PAGE aufgetragen. Als Kontrolle wurde das Lysat des Rezipienten R6 verwendet. Da für diese Versuche entscheidend ist, dieselbe Menge von Zelllysat zu verwenden, wurden immer gleichzeitig zwei gleiche SDS-Gele beladen. Nach dem Gellauf wurde mit dem einen Gel eine Immunodetektion durchgeführt (s. 2.8.5), wobei PBP1a mit dem monoklonalen Antikörper 301 und gleichzeitig PBP2b mit einer Mischung aus den monoklonalen Antikörper 502, 517, I6, III7 und 410 (zur Erkennung verschiedener Epitope) detektiert wurde, und in einem zweiten Versuch PBP2x mit Hilfe von spezifischen Kaninchen-Antikörpern bestimmt wurde. Das zweite SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt und diente dem Vergleich der aufgetragenen Mengen an Lysat. Abbildungen 3.27 und 3.28 zeigen die Ergebnisse des Western-Blots. Alle Antikörper sind spezifisch für *S. pneumoniae* PBPs, in *S. oralis* Uo5 reagieren sie auf Grund der größeren Sequenzunterschiede schwächer und die Proteine sind daher z.T. schlechter erkennbar (s. Abb. 3.27 und 3.28).



Abb. 3.27: Immunodetektion von PBP1a und PBP2b

A: Gefärbte PVDF-Membran nach dem Western-Blot; Je 5 µl Lysat wurden auf das SDS-Gel geladen. Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden diese mit anti-PBP1a- bzw. anti-PBP2b-(1. AK) und anti-Mouse-Antikörper (2. AK) detektiert.

B: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE; Je 5 µl Lysat wurden auf das SDS-Gel geladen. Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

In Abbildung 3.27A sind die detektierten Proteine PBP1a (obere Bande) und PBP2b (untere Bande) auf der gefärbten PVDF-Membran zu sehen. Alle Stämme zeigen die gleiche Signalstärke für PBP1a und PBP2b. Auch das Coomassie-gefärbte Gel in Abb. 3.27B lässt erkennen, dass in allen Spuren (bis auf das Uo5-Lysat) gleiche Mengen an Probe aufgetragen wurden. Durch dieses Ergebnis konnten MurE-bedingte Veränderungen in der Expression von *pbp1a* und *pbp2b* auf Translationsebene in den getesteten Stämmen ausgeschlossen werden.

Für die Detektion von PBP2x wurden polyklonale anti-PBP2x-Antikörper verwendet. Es wurden zwei Versuche durchgeführt (Abb. 3.28).



Abb. 3.28: Immunodetektion von PBP2x

Je 5 µl Lysat wurden auf ein SDS-Gel geladen. Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden diese mit anti-PBP2x- (1.AK) und anti-Rabbit-Antikörper (2.AK) detektiert (oben). Ein Coomassie-gefärbtes Gel diente der Kontrolle der aufgetragenen Lysatmenge (unten).

A und B: 1 und 2. Experiment

Im ersten Versuch (Abb. 3.28A) beobachtet man eine leicht stärkere Bande auf der Höhe von PBP2x in den Stämmen O(2x)UR∆murE und O(2x)UU∆murE, beides Derivate mit dem Promotor von *murE* aus *S. oralis* Uo5. Das entsprechende Coomassie-Gel lässt erkennen, dass in allen Spuren (abgesehen von dem Uo5-Lysat) gleiche Lysatmengen aufgetragen wurden. Eine zweifache Wiederholung des Versuchs konnte die beobachteten Unterschiede in der PBP2x-Menge allerdings nicht bestätigen; einer davon ist in Abb. 3.28B dargestellt. Hier zeigten alle Stämme ein gleich starkes Signal von detektiertem PBP2x. Die Menge an aufgetragenem Lysat ist nicht überall identisch, scheint allerdings in den Spuren 3, 4 und 5 gleich zu sein. In diesen Spuren sollte im Falle von unterschiedlichen Mengen an PBP2x in den Stämmen dieser Unterschied detektierbar sein.

# 3.5.10.2 Untersuchung der β-Galaktosidaseaktivität der *pbp2x*-lacZ-Fusion in Abhängigkeit von murE

Die in 3.5.10.1 beschriebenen Ergebnisse konnten keine eindeutigen Aussage darüber liefern, ob die Expression von pbp2x von murE kontrolliert wird. Über die Bestimmung der Expression des pbp2x-Promotors mit Hilfe eines lacZ-Reportersystems sollte dies überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde das integrative Plasmid pPP2 mit kloniertem Promotor von pbp2x aus S. pneumoniae R6 (pPP2pbp2x, Peters, 2009) in die Stämme O(2x)URAmurE, O(2x)RUAmurE, O(2x)UUAmurE, O(2x)RRAmurE sowie O(2x)8 transformiert. Unter Selektion mit 3 µg/ml Tetracyclin konnten Transformanten erhalten werden. Nach Überprüfung des Inserts durch Sequenzierung in den erhaltenen Stämmen wurden diese in dem β-Galaktosidase-Assay eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben. Proben wurden bei unterschiedlicher Zelldichte genommen (N=40, 60, 80 und in der stationären Phase), um mögliche Expressionsänderungen während der Wachstumsphase detektieren zu können. In Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse des β-Galaktosidase-Assay dargestellt.



Abb. 3.29: Aktivität des *pbp2x*-Promotors in Stämmen mit unterschiedlichen Promotor-Gen-Fusionen von *murE* 

Dargestellt ist die Aktivität des *pbp2x*-Promotors aus *S. pneumoniae* R6 bei verschiedenen Zelldichten in Stämmen mit unterschiedlichen Promotor-Gen-Fusionen von *murE* als  $\beta$ -Galaktosidase-Units [nmol freigesetztes ONP/(min\*mg Protein)]. Alle Stämme wurden in C-Medium angezogen bis zum Erreichen der entsprechenden Zelldichte.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass *pbp2x* unabhängig von der Wachstumsphase und von der Promotoaktivität von *murE* gleich stark mit 400 bis 600  $\beta$ -Galaktosidase-Units exprimiert wurde. Unterschiede in der Expression von *pbp2x* in den verschiedenen Stämmen konnten nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse schließen eine Abhängigkeit der *pbp2x*-Expression von der Stärke des *murE*-Promotors aus.

## 3.5.11 Einfluss des S. oralis-murE auf die Resistenz in Verbindung mit S. oralis-pbp2b

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass Mutationen in *murE* und/oder in der Promotorregion von *murE* eine Erhöhung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz hervorrufen. Höhere Resistenzniveaus wurden durch einen gleichzeitigen Austausch von *murE* und *pbp2x* erreicht. Um festzustellen, wie groß der Einfluss auf die  $\beta$ -Laktam-Resistenz von *S. oralis murE* in Verbindung mit *S. oralis pbp2b* ist, wurde das amplifizierte *S. oralis pbp2b* in P(murE) mit ausgetauschtem *murE*, transformiert. Durch Selektion auf Blutagarplatten mit 0,07 µg/ml und 0,09 µg/ml Piperacillin konnten Transformanten mit niederaffinem PBP2b erhalten werden (s. Abb. 3.30).



Abb. 3.30: PBP-Profile der PP(murE/2b)-Transformanten

Zelllysate der Transformanten (je 5 µl) wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>TM</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die PBP-Bocillin-Komplexe mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Als Kontrolle wurde der Rezipient *S. pneumoniae* R6 aufgetragen.

Alle zwölf untersuchten Transformanten schienen PBP2b ausgetauscht zu haben. Durch Sequenzierung von *pbp2b* in zwei ausgewählte Transformanten, PP(murE/2b)2 und PP(murE/2b)3, konnte dieser Austausch bestätigt werden. Die Transformante PP(murE/2b)2 zeigte eine Rekombination von PBP2b aus Uo5 zwischen den Basen 960 und 1350, wohingegen die Transformante PP(murE/2b)3 nur die bekannte T<sub>446</sub>A-Substitution besaß. Für alle PP(murE/2b)-Transformanten wurden die gleichen MHK-Werte für β-Laktame ermittelt. Für Cefotaxim zeigten der Rezipient und die Transformanten die gleiche MHK von 0,03  $\mu$ g/ml. Die Oxacillin-Resistenz stieg geringfügig an von 0,08  $\mu$ g/ml in dem Rezipient mit Austausch von MurE auf 0,1  $\mu$ g/ml in den Transformanten mit Mosaik-MurE und -PBP2b. Der deutlichste Anstieg wurde bei der Piperacillin-Resistenz beobachtet. Die MHK stieg hier von 0,05  $\mu$ g/ml in dem Rezipient auf 0,2 in den Transformanten (s. Tab. 3.19). Der

gleichzeitige Austausch von *murE* und *pbp2b* führte somit zu einer 20-fachen Erhöhung der Piperacillin-Resistenz des Ausgangstammes R6.

## 3.5.12 Einfluss des *S. oralis-murE* auf die Resistenz in Verbindung mit ausgetauschten *pbp2b* und *pbp2x*

Das nachfolgende Experiment sollte zeigen zu welchem Ausmaß Veränderungen im murE-Promotor in Verbindung mit zwei S. oralis PBPs, PBP2x und PBP2b, die Erhöhung der S. oralis pbp2b-Fragment in einem Stamm mit zuvor ausgetauschten PBP2x und MurE (Promotorbereich plus die ersten 123 Basen der Gensequenz; murE\*\*) unter Piperacillin-Selektion transformiert. Insgesamt wurden 10 Transformanten untersucht, wobei sieben davon ein niederaffines PBP2b besaßen. Die Sequenzanalysen von zwei dieser Transformanten zeigten, dass wie bei der in 3.4.2 und 3.4.3 beschriebenen Transformationen von pbp2b auch hier nur sehr kleine Stücke von pbp2b rekombiniert haben. Eine der Transformanten zeigte analog zu der Transformante P(2b) einen Austausch zwischen den Basen 1331 und 1350, welcher auf Aminosäure-Ebene zu der  $T_{446}A$ -Substitution führte (s. Abb. 3.15). Der andere untersuchte Stamm besaß ein S. oralis pbp2b-Fragment zwischen den Basen 1239 und 1350 und zeigte somit auf Aminosäure-Ebene sechs Mutationen, die zwischen dem ersten und zweiten konservierten Motiv liegen (s. Abb. 3.15). Für den nachfolgenden MHK-Vergleich (Tab. 3.19) wurde die Transformante mit dem größeren S. oralis PBP2b-Block verwendet.

Stamm	Cefotaxim [µg/ml]	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]
P(murE)	0,03	0,05	0,08
O(2x)UU∆murE	0,4	0,07	1,5
OP(2x/murE <sup>MS</sup> )	0,5	0,07-0,1	1,5
PP(murE/2b)	0,03	0,2	0,1
PCP(murE/2x/2b)	0,7	3	3-4,5
S. p. R6	0,01	0.01	0.07

Tab. 3.19: MHK-Vergleich der Transformanten mit Austausch von MurE alleine, und in Verbindung mit Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte der Transformanten mit ausgetauschtem MurE und des Ausgangstammes R6. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Die MHK Bestimmung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Tabelle 3.19 stellt eine Zusammenfassung der MHK-Werte für die  $\beta$ -Laktame Cefotaxim, Piperacillin und Oxacillin der Transformanten mit Austausch von MurE in Verbindung mit Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b dar. Da die Transformanten O(2x)UR $\Delta$ murE, O(2x)RU $\Delta$ murE und O(2x)UU $\Delta$ murE das gleiche Resistenzpotential aufweisen (s. Tab. 3.17) wurden hier die MHK-Werte nur eines dieser Stämme aufgelistet. Einen Austausch von MurE alleine führt zu einer Erhöhung der Cefotaxim- (3-fach) und Piperacillin-Resistenz (5-fach). Zusammen mit einem Mosaik-PBP2x bewirkt der Austausch von MurE eine 40- bis 50-fache Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz und einen ca. 20-fachen Anstieg der Oxacillin-Resistenz. Dabei ist nochmals zu erwähnen, dass für eine β-Laktam-Resistenzerhöhung durch murE entweder eine ausgetauschte Promotorsequenz oder ein Austausch im mittleren Bereich des Genes benötigt wird (s. 3.5.7 und 3.5.8). Das Zusammenspiel eines modifizierten MurE mit einem veränderten PBP2b bewirkt den größten (20-fachen) Anstieg in der Piperacillin-Resistenz, während die Resistenz gegenüber Cefotaxim und Oxacillin nur geringfügig erhöht wird. Bei einem gleichzeitigen Austausch von MurE, PBP2x und PBP2b beobachtet man eine deutliche Resistenzzunahme bei allen hier getesteten β-Laktamen. Während die Resistenz gegenüber Oxacillin ca. 42- bis 64-fach ansteigt, erhöht sich der MHK-Wert für Cefotaxim 70-fach. Die größte Auswirkung zeigt jedoch der gleichzeitige Austausch dieser drei Gene bei der Piperacillin-Resistenz. Hier wurde ein MHK-Wert von 3 µg/ml ermittelt, was einer 300-fachen Erhöhung der Resistenz des Ausgangsstammes R6 entspricht. Was für ein Resistenzpotential ein zusätzlich ausgetauschtes PBP1a vermittelt, müsste noch untersucht werden.

#### 3.5.13 Untersuchung möglicher Auswirkungen von *murE* auf die Zellwand-Zusammensetzung

Da es sich bei *murE* um ein Enzym handelt, welches in die Zellwandsynthese involviert ist, war es von Interesse zu erfahren, ob die höhere Expression des *S. oralis* Uo5-MurE in *S. pneumoniae* einen Einfluss auf die Zellwandbiochemie hat, alleine oder in Kombination mit *S. oralis*-PBP2x. Weiterhin war von Interesse, welche Zusammensetzung die Zellwand des hochresistenten *S. oralis* Uo5 aufweist und welche Unterschiede zu der Muropeptidprofil des sensitiven *S. pneumoniae* R6 existieren.

Für die Analyse der Zellwand-Zusammensetzung wurden R6, R6(2x), R6(murE), R6(2x/murE) und R62x/murE in C-Medium angezogen, die Zellwand wie unter 2.12 beschrieben präpariert und das Muropeptidprofil des Mureins analysiert. Dabei diente R6 als Referenz, R6(murE) und R6(2x) zur Untersuchung des alleinigen Effekts des *murE*- bzw. *pbp2x*-Austausches und R6(2x/murE) und R62x/murE zur Untersuchung der Auswirkung des Mosaik-MurE in Kombination mit *S. oralis*-PBP2x auf die Zellwandstruktur. Dabei besaß R6(2x/murE) ausschließlich *pbp2x* und *murE* aus *S. oralis* Uo5, wohingegen R62x/murE durch Transformation chromosomaler Uo5-DNA entstand.

Bei der Analyse des Muropeptidprofils der untersuchten Stämme wurden Chromatogramme erhalten (Abb. 7.1 im Anhang) mit Monomeren, Dimeren und Trimeren, deren Struktur mit den jeweiligen Peaknummern in Abb. 7.2 im Anhang aufgeführt ist. Peak 4, 9, 13, 19, 21, 23, 26, 31 und 32 repräsentieren die Haupt-Disaccharid-Peptid-Untereinheiten der Pneumokokken-Zellwand. Die Quantifizierung der Muropeptide erfolgte durch Bestimmung der Peakflächen und anschließende Berechnung des relativen Anteils der einzelnen Komponenten am Gesamtpeptidmaterial (s. Tab. 7.1 im Anhang und Abb. 3.31).



Abb. 3.31: Relativer Anteil der detektierten Muropeptide aus dem Murein am Gesamtpeptidmaterial

Gezeigt ist für die untersuchten Stämme 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. Die entsprechenden Zahlenwerte sind aus Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen.

Bei der Betrachtung der relativen Mengen an Muropeptiden fiel auf, dass die untersuchten Stämme nahezu gleiche Werte für die Peakflächen aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Stämme R6(2x/murE) und R62x/murE den gleichen genetischen Background besitzen und entsprechend in etwa den gleichen Anteil an einzelnen Komponenten aufweisen müssten, wird deutlich, dass die leichten beobachteten Ab- bzw. Zunahmen in den Peakflächen der verschiedenen Stämmen auf Schwankungen bei der Durchführung des Experiments zurückzuführen sind. Insgesamt also zeigen alle untersuchten Stämme keine signifikanten Änderungen in der Zellwandzusammensetzung. Der Austausch von MurE alleine oder in Verbindung mit Mosaik-PBP2x hat demzufolge keine Auswirkungen auf die Zellwand-Zusammensetzung.

#### Zellwand-Zusammensetzung von S. oralis Uo5

Zur Untersuchung der Zellwand-Zusammensetzung von *S. oralis* Uo5 wurde das erhaltene Chromatogramm mit den Muropeptidprofil mit dem von *S. pneumoniae* R6 verglichen (Abb. 3.32). Es ist deutlich zu erkennen, dass das *S. oralis*-Murein ein komplett unterschiedliches Muropeptidprofil besitzt.



Abb. 3.32: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5

Gezeigt sind die Chromatogramme von *S. p.* R6 und *S. o.* Uo5 für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein. 1L-Kulturen wurden in C-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wachsen gelassen. Nach Isolierung der Zellwand und Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure und Cellosyl wurden die freigesetzten Muropeptide mittels HPLC aufgetrennt. Die Detektion der eluierten Muropeptide erfolgte über die Messung der UV-Absorption bei 205 nm. Die eluierten Muropeptide sind als Peaks gegen die Retentionszeit aufgetragen. Diese sind bei R6 entsprechend der Elutionsreihenfolge nummeriert, wobei die Strukturen jedes Peaks in Abb. 7.2 im Anhang dargestellt sind. Bei *S. o.* Uo5 wurden nur die fünf größten Peaks in der entsprechende Reihenfolge nummeriert.

PentaTetra(A)<sub>2</sub>

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>

PentaTetra(A)<sub>2</sub>(deAc)<sub>2</sub>

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>(deAc)

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>(deAc)<sub>2</sub>

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>(deAc)<sub>3</sub>

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>(deAc)<sub>2</sub>(-GM)

TriTetraTetra(A)<sub>2</sub>(Glu)(deAc)(-G)

PentaTetra(A)<sub>2</sub>(Glu)(deAc)

Die fünf Muropeptidfraktionen mit den größten Peaks (Peak I-V) wurden einzeln bei der Elution gesammelt und massenspektrometrisch am Institute for Cell and Molecular Biosciences, University of Newcastle upon Tyne untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst.

 Tab. 3.20: Quantifizierung und Massenspektrometrie-Analyse der HPLC-aufgetrennten S. oralis

 Uo5-Muropeptide

Muropeptid		Peakfläche [%]	Molekulare Masse [Da]		
Nr.	Vorgeschlagene Struktur		theoretisch	ermittelt	
	Tri(A)	4,88	898.4257	898.4349	
II	Tri(A)(Glu)(deAc)	5,39	856.4151	856.4244	
	Tri(A)	24,05	897.4417	897.4511	
IV	Tri(A)(deAc)	8,91	855.4311	855.4458	
V	TetraTri(A) <sub>2</sub> (Glu)	12,48	1847.8469	1847.9774	

Desweiteren wurden die molekularen Massen von Strukturen ermittelt, die im gesamten unreduzierten Muropeptid-Mix vorhanden waren. In Tabelle 3.21 sind diese Massen mit den dazugehörigen Strukturvorschlägen aufgelistet.

	theoretische	ermittelte				
Muropeptide	molekulare Masse [Da]	molekulare Masse [Da]				
Di(deAc)	6.532.756	6.536.417				
Tri	8.233.811	8.233.937				
Tri(A)	8.944.182	8.944.171				
Tri(A)(deAc)	8.524.077	8.524.078				
Tri(A)(Glu)	8.954.022	8.954.219				
Tri(A)(Glu)(deAc)	8.543.995	8.543.978				
TriTetra(A)(deAc) <sub>2</sub>	16.868.047	16.868.015				
TriTetra(A) <sub>2</sub>	18.418.630	18.419.081				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (deAc)	17.998.524	17.998.658				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (-G)	16.387.836	16.388.059				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (deAc)(-G)	15.967.730	15.967.899				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (-GM)	13.636.831	13.636.834				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)	18.428.471	18.428.729				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(deAc)	18.008.365	18.008.921				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(deAc) <sub>2</sub>	17.588.259	17.588.441				
TriTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(-GM)	13.646.672	13.641.837				
TetraTetra(A) <sub>2</sub>	19.129.001	19.129.745				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)	19.138.841	19.139.461				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(deAc)	18.718.735	18.719.293				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(-G)	17.108.047	17.108.018				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(deAc) <sub>2</sub> (-G)	16.267.836	16.268.020				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(-GM)	14.357.042	14.357.289				
TetraTetra(A) <sub>2</sub> (Glu)(deAc)(-GM)	13.936.937	13.937.020				

19.839.372

18.999.161

19.429.107

27.182.706

26.762.601

26.342.495

25.922.389

21.560.697

24.321.541

Tab. 3.21: Molekulare Massen von nicht-reduzierten S. oralis Uo5-Muropeptide, detektiert mittels micro-HPLC-LTQ-FT Massenspektrometrie

19.839.997

18.998.811

19.429.380

27.183.416

26.762.941

26.342.622

25.922.449

21.560.950

24.321.906

Muropontido	theoretische molekulare Massa [Da]	ermittelte melekulare Massa [Da]
TriTetra Letra (A) $_2(Glu)(deAc)(-GM)$	21.990.642	21.990.648
$I ri I etra I etra (A)_3 (deAc)$	27.472.972	27.473.826
I ri l etra l etra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>2</sub>	27.052.866	27.053.193
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAC) <sub>3</sub>	26.632.760	26.633.111
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc)(-G)	25.442.178	25.442.751
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>2</sub> (-G)	25.022.072	25.022.715
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (Glu)	27.902.918	27.903.950
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (Glu)(deAc)	27.482.812	27.483.776
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (Glu)(deAc) <sub>2</sub> (-GM)	22.280.907	22.281.016
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (Glu)(deAc) <sub>3</sub> (-GM)	21.860.802	21.865.697
TriTetraTetra(A) <sub>3</sub> (Glu) <sub>2</sub> (deAc) <sub>2</sub>	27.072.546	27.073.387
TetraTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>3</sub> (-GM)	22.561.333	22.741.418
PentaTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>2</sub>	28.473.608	28.474.493
TriTetraTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>2</sub>	35.816.943	35.817.898
TriTetraTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>3</sub>	35.396.837	35.396.826
TriTetraTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>2</sub> (-G)	33.786.149	33.786.840
TriTetraTetraTetra(A) <sub>3</sub> (deAc) <sub>3</sub> (-G)	33.366.043	33.366.480
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc)	36.947.419	36.948.854
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc) <sub>2</sub>	36.527.314	36.528.380
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc) <sub>2</sub>	45.291.390	45.292.721
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc) <sub>3</sub>	44.871.284	44.872.470
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc) <sub>4</sub>	44.451.179	44.452.330
TriTetraTetraTetra(A) <sub>4</sub> (deAc) <sub>3</sub> (-G)	42.840.491	42.841.410
TriTetraTetraTetraTetra(A)5(deAc)2	46.001.761	46.003.093
TriTetraTetraTetra(A) <sub>5</sub> (deAc) <sub>3</sub>	45.581.686	45.582.991

Auffallend ist, dass alle aufgelisteten verzweigten Muropeptide ein Alanin als Verzweigung besitzen. Diese Auffälligkeit ist mit der in der Arbeitsgruppe beobachtete Abwesenheit eines *murN*-Homolog in *S. oralis* Uo5 in Übereinstimmung. In *S. pneumoniae* kommt die Dipeptid-Verzweigung an dem Muropeptid durch die Reaktion der Enzyme MurM und MurN zustande, wobei MurM die erste Aminosäure, L-Serin oder L-Alanin, und MurN die zweite Aminosäure, L-Alanin, anhängt. In *S. oralis* scheint als erste und einzige Aminosäure L-Alanin als Verzweigung zu fungieren. Bei den erhaltenen Strukturen kann man allerdings keine Aussage darüber treffen, ob das Alanin verzweigt ist (d.h. an der ε-Aminogruppe des Lysins sitzt) oder an Position 4 im Stammpeptid. Aus der Tabelle wird zudem deutlich, dass einige Muropeptide Glutamat statt Glutamin an Position 2 besitzen. Weiterhin scheint *S. oralis* Uo5 ein *pgdA*-Homolog zu besitzen, da in den meisten erhaltenen Muropeptidstrukturen der N-Acetylglukosamin-Rest zu Glukosamin deacetyliert ist. Zu beobachten sind auch neben den mono-, di- und trimeren Strukturen einige tetra- und pentameren Strukturen.

### 3.6 Übertragung weiterer Resistenzdeterminanten mittels Transformation chromosomaler *S. oralis* Uo5-DNA

Nach erfolgreicher Übertragung der drei hohe-β-Laktam-Resistenz-vermittelnden PBPs PBP2x, PBP2b und PBP1a, zusammen mit der in dieser Arbeit neu identifizierten Resistenzdeterminante MurE (s. 3.1-3.4), stellte sich die Frage, ob durch nachfolgende Transformationen mit chromosomaler Uo5 DNA die Resistenz des Ausgangsstammes weiter

erhöht werden kann. Die vier oben genannten Resistenzdeterminanten bewirkten zwar einen deutlichen Anstieg der  $\beta$ -Laktam-Resistenz, die MHK des Donorstammes konnte jedoch nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wurde durch drei weitere aufeinander folgende Transformationen mit chromosomaler Uo5 DNA und PCP7 als Rezipient (s. 3.4.1) versucht, die  $\beta$ -Laktam-Resistenz von *S. oralis* Uo5 zu übertragen. Die Selektion erfolgte in der ersten und zweiten Stufe mit Cefotaxim, bei der dritten Transformation wurde Oxacillin für die Selektion eingesetzt. Abbildung 3.33 stellt eine Zusammenfassung aller Stufen der sukzessiven DNA-Transformation dar, wobei die Schritte 1-3 in Kapitel 3.2-3.4 beschrieben wurden, und die Schritte 4-6 in diesem Kapitel besprochen werden.



Abb. 3.33: Ablauf der in dieser Arbeit durchgeführten S. oralis Uo5 DNA-Transformationen

Gezeigt ist schematisch der Ablauf der sukzessiven Transformation, wobei die blauen Zahlen die Reihenfolge der einzelnen Schritte darstellen. Oben sind die Selektionsantibiotika angegeben, die für die einzelnen Transformationen verwendet wurden. Jeder Pfeil stellt eine Transformationsstufe dar, wobei chromosomale Uo5-DNA in den entsprechenden Rezipienten transformiert wurde. Am Ende jedes Pfeiles stehen die erhaltenen Transformanten, wobei die Bezeichnung der Stämme auf die verwendeten Selektionsantibiotika in der Reihenfolge, wie sie benutzt wurden, zurückzuführen ist (P: Piperacillin, C: Cefotaxim; O: Oxacillin). Gelb unterlegt sind die Transformationsschritte, besprochen in diesem Kapitel.

Bei den drei letzten Transformationsversuchen konnten Transformanten erhalten werden, allerdings mit deutlich schlechterer Effizienz im Vergleich zu den ersten drei Selektionsstufen, die in Abb. 3.33 aufgeführt sind. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise durch die großen Sequenzunterschiede zwischen *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 keine Rekombinationsmöglichkeiten existieren, so dass weitere Resistenzdeterminanten nicht übertragen werden können. Die erhaltenen Ergebnisse (s. Tab. 3.22) lassen vermuten, dass durch die Transformation lediglich Punktmutationen selektioniert wurden.

Transfor-	Selektion	Antibiotika-	Transformanten	Negativkontrolle
manten		konzentration [µg/ml]	[cfu/ml]	[cfu/ml]
PCPC	Cef	2,8-3,6	n.a.	n.a.
		3,8	780	420
PCPCC	Cef	4	n.a	n.a
		4,5	4650	3350
		5	1050	1450
		5,5	250	250
PCPCCO	Oxa	28	n.a.	n.a.
		30	900	400
		32	100	150

Tab. 3.22: Selektion der Transformanten der	Transformationsstufen vier bis sechs
---	--------------------------------------

Aufgeführt sind die erhaltenen Ergebnisse bei den Transformationsstufen vier bis sechs. Die jeweiligen Selektionskonzentrationen und die dabei aus dem Transformationsansatz bzw. der Negativkontrolle jeweils hervorgegangene Anzahl an Kolonien sind aufgelistet. Es wurden 200 µl von geeigneten Verdünnungen eines Transformationsansatzes ausplattiert. Rot unterlegt sind die Selektionskonzentrationen, bei denen Kolonien für weitere Analysen gepickt wurden. cfu: colony forming units; n.a.: nicht auszählbar aufgrund von Bakterienrasen auf der Selektionsplatte

Insgesamt beobachtet man einen Abfall der Kolonienzahl mit steigenden Antibiotikakonzentrationen. Bei der Negativkontrolle wurde die gleiche oder eine größere Anzahl an Kolonien erhalten als auf den Platten mit dem Transformationsansatz. Gepickt wurden Kolonien bei der jeweiligen Konzentration, bei der auf der Platte der Negativkontrolle weniger Kolonien vorhanden waren als auf der Selektionsplatte (rot unterlegt). Die Transformanten wurden einem MHK-Test für das jeweilige Selektionsantibiotikum unterzogen, um beurteilen zu können, in wie fern die β-Laktam-Resistenz übertragen werden konnte. Alle PCPC-Transformanten verhielten sich gleich in Bezug auf ihre MHK für Cefotaxim, die bei 5 µg/ml lag. Die PCPCC-Transformanten zeigten ebenfalls gleiche MHK-Werte für Cefotaxim (6 µg/ml). Die MHK-Werte für Oxacillin der PCPCCO-Transformanten zwischen 30 und 40 µg/ml. Wie auch in den zuvor beschriebenen lagen Transformationsstufen eins bis drei, wurde auch hier je eine Transformante ausgewählt (mit der höchsten MHK), mit der weiter gearbeitet wurde und die repräsentativ für alle Transformanten in der jeweiligen Transformation steht. Durch Vergleich der PBP-Profile der Transformanten mittels SDS-PAGE konnte festgestellt werden, dass kein weiteres S. oralis PBP übertragen wurde (Abb. 3.34).



Abb. 3.34: PBP-Profile der Transformanten aus den einzelnen Transformationsstufen

Je 5 µl Zelllysat wurden mit 3,75 µM Bocillin<sup>™</sup>FL (final) 10 min bei 37°C inkubiert und auf ein 7,5 %-iges SDS-Gel (0,275 % BAA, s. 2.8.2) aufgetragen. Die PBP-Bocillin-Komplexe wurden nach ihrer Auftrennung mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Die Nummer der Transformationsstufe, in der der jeweilige Transformant entstanden ist, ist unten gezeigt.

Während von Stufe 1 bis 3 auf der SDS-PAGE die Transformation niederaffiner PBPs von *S. oralis* deutlich ist, können bei den Transformanten der Stufen 4 bis 6 keine zusätzlichen Veränderungen im PBP-Muster festgestellt werden. Bei diesen Transformationen sind also wahrscheinlich andere, Nicht-PBP-Gene betroffen.

# 3.6.1.1 β-Laktam-Resistenz der in den sukzessiven Transformationen erhaltenen Stämmen

Die aus jeder Transformationsstufe ausgewählten Transformanten wurden in einem Plattenverdünnungstest zur Bestimmung der MHK auf ihr Resistenzpotential untersucht. Um genaue Aussagen über die Unterschiede in der MHK zwischen den verschiedenen Stämmen machen zu können war es dabei wichtig, diese direkt untereinander zu vergleichen, d.h. alle Stämme wurden in dem gleichen Experiment zur MHK-Bestimmung getestet. Tabelle 3.23 fasst die Ergebnisse der Bestimmung der β-Laktam-Resistenz aller Transformanten zusammen, wobei die Werte aus mindestens drei unabhängigen Tests hervorgehen. Als Referenz sind die MHK-Werte des Ausgangsstammes *S. pneumoniae* R6 und des Donorstammes *S. oralis* Uo5 aufgelistet, wobei die MHK-Werte von Uo5 für Piperacillin und Oxacillin mittels E-Test ermittelt wurden.

			МНК		x-facher Anstieg der MHK im Vergleich zur Vorstufe			
Stamm	Transforma- tionsstufen	Cefotaxim [µg/ml]	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]	Cefotaxim [µg/ml]	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]	
<i>S.p</i> . R6		0,01	0,01	0,07				
P20	1	0,4	0,06	1,5	40	6	21	
PC3	2	1,5-2	0,1	2	3,8-5	1,7	1,3	
PCP7	3	2- 3,0	2,5-3	20-24	1,3-1,5	25-30	10-12	
PCPC	4	4-4,5	3-3,5	24-28	1,5-2	1,2	1,2	
PCPCC	5	6-7,0	3-4,0	26-30	1,5	1,2	1,1	
PCPCCO	6	6-7,0	6-7,0	35-40	-	1,8-2	1,3	
S. o. Uo5		10	96*	>256*				

### Tab. 3.23: β-Laktam-Resistenz der Transformanten, erhalten durch sukzessive Transformation chromosomaler Uo5-DNA

Gezeigt sind die mittels Plattenverdünnungsmethode ermittelten MHK-Werte aller Stämme, erhalten mittels Transformation chromosomaler Uo5-DNA und die der Ausgangstämme *S. p.* R6 und *S. o.* Uo5. Durch die Abstufung der Antibiotikakonzentrationen in 0,01er bzw. 0,1er µg/ml-Schritten konnten die Resistenzniveaus und Kreuzresistenzspektren der Transformanten bestimmt werden. Gelb unterlegt sind die Transformanten, die in den letzten drei Selektionsstufen erhalten wurden.

Die MHK Bestimmung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

\*: Werte ermittelt mittels E-Test; S.p.: S. pneumoniae; S. o.: S. oralis

Deutlich zu sehen ist, dass die MHK-Werte nach jeder Transformationsstufe steigen. Die MHK-Werte von S. oralis Uo5 konnten nach sechs Transformationsstufen allerdings immer noch nicht erreicht werden. Die kleinste Differenz zwischen den Werten des Donors und der letzten Stufe-Transformante ist bei Cefotaxim zu beobachten. Nach sechs Transformationsstufen konnte das Resistenzpotential von R6 für Cefotaxim und Piperacillin etwa 600-700-fach erhöht werden, für Oxacillin konnte das Resistenzpotential etwa 500-570fach erhöht werden. Eine Übertragung von PBP2x zusammen mit Mosaik-MurE bewirkte eine 40-fache Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz und eine ca. 21-fache Erhöhung der Oxacillin-Resistenz. Durch die Übertragung von pbp1a aus S. oralis Uo5 wurde die MHK für Cefotaxim nochmal um 1,1-1,6 µg/ml erhöht. Dies macht einen 3,7-5-fachen Anstieg der Cefotaxim-Resistenz aus. Die Übertragung von Mosaik-PBP2b brachte den höchsten Anstieg der Piperacillin-Resistenz (25-30-fach) mit sich. Die letzten drei Transformationsstufen zusammen führten in etwa zu einer Verdoppelung der MHK-Werte der Transformante PCP.

### 3.6.1.2 DNA-Microarray-Analyse der in den sukzessiven Transformationen erhaltenen Stämmen

Im Folgenden wurden einige der Transformanten einer DNA-Microarray-Analyse unterzogen, um feststellen zu können, welche Gene bei den Transformationen übertragen wurden und somit die Identifizierung neuer potentieller Resistenzdeterminanten zu ermöglichen. Allerdings können auf diese Weise nur Veränderungen detektiert werden, die sich im Sequenzbereich der Oligonukleotide abspielen, auf denen der Microarray basiert. Die einzelnen Transformanten wurden hierbei mit dem Wildtyp *S. pneumoniae* R6 verglichen, wobei die Durchführung des Experimentes wie unter 2.11 beschrieben erfolgte. Bei der Durchführung der Microarray-Analyse der Transformante P20 (s. 3.5.1) wurde eine Ratio von 0,5 als Schwellenwert für den Austausch eines Genes verwendet. Bei diesem Schwellenwert fiel allerdings das resistenzrelevante *murE* nicht unter die signifikanten, obwohl durch Sequenzierung den Austausch festgestellt werden konnte (s. 3.5.2). Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Microarray-Analysen eine Ratio von 0,66 als Schwellenwert verwendet, um mögliche Verluste ausgetauschter Gene in der Auswertung zu verringern. Tabelle 3.24 fasst die Ergebnisse der DNA-Microarray-Analysen der Transformanten zusammen.

#### Tab. 3.24: Durch DNA-Microarray erfasste ausgetauschte Gene in den Transformanten

Rot ausgefüllte Rechtecke bedeuten einen Austausch des jeweiligen Genes in der entsprechenden Transformante, wobei die Zahl die Ratio angibt.

Oligo	Produkt	Gen	P20	PC3	PCP7	PCPC	PCPCC
spr0099	ABC transporter membrane-spanning permease - amino acid transport	ABC-MSP	0,97	0,9	0,64	0,9	0,82
spr0148	Succinyl-diaminopimelic descuccinlyase (ArgE/DapE/Acy1 family protein)	dapE	0,93	0,99	0,26	0,35	0,29
spr0202	30S Ribosomal protein S14	rpsN	1,33	0,84	0,63	1,1	1
spr0305	Undecaprenyl-phosphate-UDP-MurNAc-pentapeptide phospho-MurNAc-pentapeptide transferase	mraY	0,16	0,16	0,18	0,34	0,32
spr0329	Penicillin-binding protein 1A	pbpA	1,06	0,15	0,25	0,19	0,26
spr0711	ATP-dependent DNA helicase	dinG	0,65	1,1	1	1,1	1,15
spr0755	Conserved hypothetical protein		0,88	1,14	0,36	0,23	0,18
spr0756	Topoisomerase IV subunit B	parE	1,03	1,03	0,24	0,19	0,15
spr0985	Hypothetical protein		1,14	0,83	0,95	0,34	0,42
spr1046	Integrase/recombinase	xerC	0,65	0,25	0,41	0,25	0,35
spr1384	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-L- lysine Ligase	murE	0,62	0,3	0,36	0,48	0,49
spr1385	Hypothetical protein		0,26	0,21	0,32	0,46	0,16
spr1386	Hypothetical protein		0,78	0,41	0,52	0,69	0,59
spr1387	Hypothetical protein		0,08	0,2	0,22	0,39	0,34
spr1517	Penicillin-binding protein 2B	pbp2b	1,02	1,03	0,26	0,26	0,22
spr1518	Conserved hypothetical protein		1,04	1,19	0,36	0,36	0,26
spr1530	Conserved hypothetical protein		1,16	0,95	0,62	1,09	1,07
spr1649	Conserved hypothetical protein		1,17	0,81	0,86	0,9	0,58
spr1747	Hypothetical protein		0,95	1,06	0,88	0,56	0,64
spr1764	Hypothetical protein		1,05	1,06	0,87	0,96	0,66
spr1815	Histidine kinase	hk11	1,1	0,83	0,78	0,64	0,66
spr2007	Conserved hypothetical protein		0,9	0,91	1,06	0,87	0,6
spr2044	Conserved hypothetical protein		1,13	0,88	1,1	0,64	0,59

Durch die aufeinanderfolgenden Transformationen mit chromosomaler Uo5-DNA wurde eine Reihe von Genen übertragen. Einige der aufgelisteten Gene, wie z.B. *mraY*, *xerC* oder *murE* fielen schon im ersten Schritt als ausgetauscht auf und konnten auch als solche bei den Transformanten der nachfolgenden Stufen bestätigt werden. Gene dagegen, die nur einmal, in der Transformantenreihe als signifikant aufgelistet wurden, und zwar nicht in der letzten Transformationsstufe, wurden als nicht ausgetauscht betrachtet. So z.B. *dinG*, *spr0099*, *spr0202* oder *spr1530*, die in den nachfolgenden Stufen nicht als signifikant zu finden sind. Da die Transformanten aufeinander aufbauen, ist es nicht möglich, dass ein Gen bei einer Transformation ausgetauscht wurde, in der folgenden aber nicht mehr. Durch Ausschluss solcher Gene, ermöglicht die Tabelle eindeutige Aussagen über den Gentransfer bei den verschiedenen Transformationsstufen. In der ersten Transformation wurden unter Berücksichtigung der Tabelle 3.24 und der Sequenzier-Ergebnissen in Kapitel 3.2.4 und 3.5.2 pbp2x, mraY, xerC, murE und die downstream von murE gelegenen spr1385-spr1387, die für hypothetische Proteine kodieren, übertragen. Laut Microarray-Analyse wurde in Transformante der zweiten Stufe zusätzlich nur noch *pbp1a* übertragen. Die Transformante der dritten Selektionsstufe weist fünf weitere Gene auf: neben pbp2b mit dem downstream gelegenen spr1518, kodierend für ein hypothetisches Protein, wurden in dieser Transformante ein weiteres hypothetisches Protein, sowie dapE und parE übertragen. DapE ist involviert in der mDAP/Lysin-Biosynthese, welche die einzige Quelle für Lysin in Bakterien darstellt, und katalysiert die Hydrolyse von N-Succinyl-L-Diaminopimelat zu L-Diaminopimelat und Succinat. Die Deletion von dapE in Helicobacter pylori, sowie Haemophilius influenzae wurde als lethal beschrieben (Gillner et al., 2009, Karita et al., 1997). Das Produkt des zweiten ausgetauschten Gens parE bildet zusammen mit ParC die Topoisomerase IV. Mutationen in den Genen der Topoisomerase IV und DNA-Gyrase (gyrA und gyrB) führen zu Resistenz gegen Quinolone (Gonzáles et al., 1998, Dupont et al., 2005). Neben Mutationen verantwortlich für diese Resistenz, sind auch Mosaik-Strukturen von parE in klinischen resistenten Isolaten beschrieben (de la Campa et al., 2009; Perichon et al., 1997).

Vier zusätzlich ausgetauschte Gene lässt Tabelle 3.24 in der Transformante der nächsten Stufe erkennen. Das sind drei hypothetische Proteine (*spr0985*, *spr1747* und *spr2044*) sowie die Histidinkinase des Zwei-Komponenten-Systems 11, die zuvor mit β-Laktam-Resistenz in Verbindung gebracht wurde. Die Deletion von der Histidinkinase und Response-Regulators des Zwei-Komponenten-Systems 11 führt zu einem Abfall der MHK für Piperacillin in Laborstämmen von *S. pneumoniae* (Volz, 2008). Bei der letzten Stufe in Tabelle 3.24 kommen drei weitere Gene hinzu, die für hypothetische Proteine kodieren.

Da viele der aufgelisteten Gene eine Ratio aufweisen, die sehr nah an dem festgesetzten Schwellenwert liegt, müsste durch Sequenzierung überprüft werden, ob diese Gene tatsächlich ausgetauscht wurden. Eine Identifizierung der resistenzrelevanten Gene, die für den beobachteten Resistenzanstieg in den letzten Transformationsstufen verantwortlich sind, erfordert weitere Untersuchungen.
# 4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung und Übertragung der Penicillinresistenz von einem hochresistenten *S. oralis*-Isolat auf *S. pneumoniae*. Durch sukzessive Transformationen sollte überprüft werden, ob sich der Resistenzphänotyp des Donorstammes übertragen lässt und welche Gene dabei eine Rolle spielen. Zudem sollten Resistenzmechanismen aufgedeckt werden, welche nicht auf Modifikationen in den PBPs beruhen. Die Ergebnisse der sukzessiven Transformationen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert, wobei zunächst auf die PBP-Veränderungen und PBP-vermittelte Resistenz eingegangen wird. Im zweiten Teil der Diskussion wird MurE als eine neue, PBP-unabhängige Resistenzdeterminante vorgestellt und ihre Rolle für die Resistenzentwicklung diskutiert. Ein kurzer Ausblick zeigt mögliche weiterführende Experimente auf.

# 4.1 Übertragung der β-Laktam-Resistenz von S. oralis auf S. pneumoniae

In bisher beschriebenen Versuchen zur Übertragung der Penicillin-Resistenz von *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* konnte ausschließlich das Mosaik-PBP2x transferiert werden (Becker, 2008; Reichmann *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit durch sukzessive DNA-Transformation mit dem Penicillin-resistenten *S. oralis* als Donor die drei nierderaffinen PBP1a, PBP2x und PBP2b in den Laborstamm *S. pneumoniae* R6 eingebracht werden. Diese drei PBPs spielen die Hauptrolle bei der Entwicklung von  $\beta$ -Laktam-Resistenz in klinischen Isolaten und Modifikationen in diesen Genen führen zu hohen Resistenzniveaus (Barcus *et al.*, 1995; Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992).

### 4.1.1 S. oralis PBP2x und die β-Laktam-Resistenz

Mutationen in PBP2x bzw. PBP2b führen zu einer primären, relativ geringen Resistenzerhöhung, sind aber die Voraussetzung dafür, dass zusätzliche Veränderungen in PBP1a zu hohen Resistenzniveaus führen (Kell *et al.*, 1993; Hakenbeck *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, zuerst PBP2x und/oder PBP2b in den R6 Stamm zu transferieren, wobei das β-Laktam Oxacillin für die Selektion von PBP2x und Piperacillin zur Selektion von PBP2b verwendet wurde. Während diese Strategie seit langem erfolgreich verwendet wird, um *S. pneumoniae* PBPs von resistenten in sensitive Stämme zu transformieren, zeigten sich mit *S. oralis* Uo5 DNA schon in diesen Versuchen unerwartete Schwierigkeiten. PBP2b konnte in der ersten Transformationsstufe mit chromosomaler Uo5-DNA nicht übertragen werden, sondern unabhängig vom selektiven Antibiotikum war in den Transformanten wenn überhaupt nur ein verändertes PBP2x vorzufinden. Dabei müssen allerdings zwei Dinge berücksichtigt werden. Zum einen können

PBP2x-Mutationen nicht nur mit Cefotaxim selektioniert werden (Laible und Hakenbeck, 1991), sondern abhängig von den Mutationen, die zur Affinitätserniedrigung von PBP2x beitragen, können auch Oxacillin und Piperacillin zur Selektion verwendet werden (Hakenbeck *et al.*, 1994; Zerfass, 2010). Zum anderen vermittelt *pbp2b* sehr geringe Resistenzniveaus, auch wenn es von hochresistenten Donorstämmen stammt, weshalb nur eine äußerst geringe Konzentrationsbreite für dessen Selektion zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu vermittelt PBP2x eine gut selektionierbare Resistenz. Werden daher beide Gene gleichzeitig angeboten, wie es bei Transformation mit chromosomaler Uo5-DNA der Fall ist, wurden bevorzugt Transformanten erhalten mit dem Uo5-PBP2x (s. Kap. 3.2.2). Der Vergleich verschiedener solcher Transformanten zeigte, dass alle zumindest die Transpeptidase-Domäne des resistenten PBP2x enthielten, auf der die resistenzrelevanten Mutationen vorhanden sein sollten.

In der Transpeptidase-Domäne von PBP2x des S. oralis Uo5 sind im Vergleich zum S. pneumoniae R6 PBP2x 37 Aminosäure-Substitutionen vorzufinden. Einer der wohl bedeutendsten resistenzrelevanten Mutationen befindet sich an Position 338. Hier sind in klinischen resistenten Isolaten Mutationen vorzufinden, meistens T<sub>338</sub>A oder seltener T<sub>338</sub>P und T<sub>338</sub>G, wobei die letzten beiden Substitutionen vor allem in hoch-Cefotaxim-resistenten Stämmen vorkommen. Rückmutationen dieser Substitutionen konnten die Bedeutung dieser Position für die β-Laktam-Resistenz zeigen (Carapito et al., 2006; Chesnel et al., 2003; Chi et al., 2007; Dessen et al., 2001; Mouz et al., 1998; Mouz et al., 1999; Smith und Klugman, 2005; Zerfass, 2010). T<sub>338</sub> liegt als Bestandteil des konservierten STMK-Motivs im aktiven Zentrum von PBP2x und ist zusammen mit  $S_{571}$  und  $Y_{586}$  in die Bindung eines Wassermoleküls involviert. Durch die Substitution an dieser Position kommt es zum Verlust der OH-Gruppe, involviert in dieser Bindung, und somit zur Reduktion der Acylierung des aktiven Serins durch  $\beta$ -Laktamantibiotika (Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1998). Im S. oralis PBP2x sind auch weitere Substitutionen vorzufinden, die bereits in klinischen Streptokokken-Isolaten beschrieben wurden. Dazu gehören u.a. M<sub>343</sub>T, S<sub>389</sub>L, T<sub>400</sub>S und S<sub>574</sub>T (Chesnel et al., 2003). Den Substitutionen I<sub>371</sub>T, R<sub>384</sub>S, T<sub>400</sub>S, D<sub>567</sub>N und N<sub>605</sub>T konnte bereits eine Rolle in der β-Laktam-Resistenz zugeschrieben werden. Mutationen an diesen Positionen führen zum Verlust der Affinität des Proteins für β-Laktamantibiotika (Carapito et al., 2006). Die Mutation I<sub>366</sub>M wurde in resistenten S. mitis und S. oralis Stämmen beobachtet, ihre Bedeutung für die β-Laktam-Resistenz ist jedoch noch ungeklärt (Hakenbeck et al., 1998; Reichmann et al., 1997). Das gleiche gilt auch für die Mutation L<sub>546</sub>V, die in mehreren Penicillin-resistenten S. pneumoniae-Isolaten vorkommt (Nagai et al., 2002; Nichol et al., 2002). Auch die L<sub>364</sub>F-Substitution, die in resistenten Pneumokokken-Isolaten vorzufinden ist, scheint eine wichtige Rolle in der β-Laktam-Resistenz zu spielen (Sibold et al., 1994). Eine Rückmutagenese dieser Substitution führte zum Abfall der MHK

für Cefotaxim und Penicillin (Smith und Klugman, 2005). Insgesamt weist PBP2x aus *S. oralis* Uo5 Mutationen in der Transpeptidase-Domäne auf, die zum Teil in sensitiven, aber auch in resistenten *S. mitis, S. oralis* und *S. pneumoniae* Stämmen vorkommen. Wie in Abb. 3.6 gezeigt, ist die Sequenz von *S. oralis* Uo5 PBP2x ab Aminosäure 241 sehr ähnlich zu dem Mosaikblock von PBP2x des hochresistenten spanischen *S. pneumoniae* Klons Spain1-<sup>23F</sup>. Dies gibt nochmal einen Hinweis auf die Existenz eines globalen Genpools, der verschiedenen Streptokokken zur Verfügung steht, und lässt vermuten, dass auch das *S. oralis* Uo5 PBP2x das Produkt von horizontalem Gentransfer ist. Interessanterweise unterscheidet sich das PBP2x von Uo5 in nur wenigen Positionen von PBP2x<sup>23F</sup>: so vermittelt die Mutation T<sub>338</sub>G in Uo5 eine höhere Resistenz als die T<sub>338</sub>A-Substitution (wie in *S. pneumoniae* Spain1-<sup>23F</sup>); man kann vermuten, dass an dieser Position eine sekundäre Mutation in *S. oralis* Uo5 stattgefunden hat.

Die Transformation des Mosaik-PBP2x aus *S. oralis* Uo5 führte zu einer 20-fachen Erhöhung des MHK-Werts für Cefotaxim im Vergleich zum Ausgangsstamm R6, wohingegen die Piperacillin-MHK lediglich um einen Faktor zwei erhöht war. Dies stimmt damit überein, dass Modifikationen in PBP2x einen deutlicheren Effekt auf die Cefotaxim-MHK als auf die Penicillin-MHK zeigen (Coffey *et al.*, 1995; Laible und Hakenbeck, 1987). Die Oxacillin-MHK ist mit einem Wert von 0,4 µg/ml um etwa den Faktor 6 im Vergleich zum R6 erhöht. Das bestätigt die Beobachtungen von Dowson *et al.*, 1994, dass allein ein niederaffines PBP2x aus Penicillin-resistenten Isolaten zu einer intermediären Oxacillin-Resistenz führen kann (Dowson *et al.*, 1994). Generell sind die erhaltenen MHK-Werte in Übereinstimmung mit den durch Mosaik-PBP2x vermittelten MHK-Werten, die in der Literatur beschrieben sind (Dowson *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1998; Reichmann *et al.*, 1997).

Bei der Transformation des amplifizierten *S. oralis pbp2x*-Fragmentes konnten ebenfalls Transformanten mit niederaffinem PBP2x erhalten werden. Obwohl sich hier das rekombinierte PBP2x-Fragment auf die Transpeptidase-Domäne beschränkte, wurden die gleichen MHK-Werte für die getesteten β-Laktame ermittelt, wie die von der Transformante O4, die das komplette Uo5-Gen besaß. Dies bestätigt, dass nur Mutationen in der Transpeptidase-Domäne einen Einfluss auf die β-Laktam-Resistenz ausüben.

#### 4.1.2 S. oralis PBP1a und die β-Laktam-Resistenz

In einer zweiten Transformationsstufe mit Cefotaxim als Selektionsantibiotikum konnte *pbp1a* aus *S. oralis* Uo5 auf die P20-Transformante übertragen werden. Von zwölf untersuchten Transformanten war allerdings nur bei zwei ein niederaffines PBP1a vorzufinden, die auch eine besonders hohe MHK im Vergleich zum Rezipienten hatten. In den anderen untersuchten Transformanten war zumindest über Bocillinmarkierung keine Veränderung in PBP1a zu entdecken, allerdings wurde nicht versucht, geringe Affinitätsunterschiede durch

andere Markierungsprotokolle (niedrige Temperatur, kurze Inkubationszeiten) sichtbar zu machen. Versuche, ein gereinigtes *pbp1a* als PCR-Produkt zu transformieren blieben erfolglos; allerdings sollten diese Versuche unter anderen Bedingungen, z.B. andere Selektionskonzentrationen, nochmals wiederholt werden. Offenbar ist der Transfer des *S. oralis pbp1a* in *S. pneumoniae* aber schwieriger als erwartet.

Eine der beiden R6-Transformanten mit niederaffinem PBP1a hatte das komplette Uo5-Gen rekombiniert, in der zweiten war es ab bp 280 vorhanden. In der Transpeptidase-Domäne von *S. oralis* Uo5 PBP1a sind 57 Aminosäure-Austausche im Vergleich zum R6 vorhanden. Literaturrecherchen ergaben, dass fast alle dieser Substitutionen in intermediär- bis hochresistenten klinischen Streptokokken vorkommen (Asahi und Ubukata, 1998; du Plessis *et al.*, 1999; Ferroni und Berche, 2001; Smith und Klugman, 1998; Smith und Klugman, 2003). Sequenzvergleiche von PBP1a aus resistenten Pneumokokken-Isolate aus Südafrika zeigten, dass diese sechs Substitutionen: T<sub>574</sub>N, S<sub>575</sub>T, Q<sub>576</sub>G, F<sub>577</sub>Y hinter der KTG-Box, sowie L<sub>583</sub>M und A<sub>585</sub>V gemeinsam haben. Sie kommen sowohl bei Isolaten mit Penicillin-MHK von 0,25 bis 1 µg/ml als auch bei hochresistenten Stämmen mit einer MHK von  $\ge 2$  µg/ml vor. Im Gegensatz dazu wurden die bekannten T<sub>371</sub>A/S in dem konservierten STMK-Motiv, P<sub>432</sub>T, sowie I<sub>459</sub>M und S<sub>462</sub>A nur in Isolaten mit einer Penicillin-MHK von  $\ge 1$  µg/ml beobachtet (Smith und Klugman, 1998).

Die Substitution T<sub>371</sub>A/S ist bereits in mehreren resistenten Isolaten beschrieben worden, wobei gezeigt werden konnte, dass die Reversion dieser Mutation zu einem Abfall der Resistenz führt (Asahi und Ubukata, 1998; Ferroni und Berche, 2001; Nagai et al., 2002; Nichol et al., 2002; Smith und Klugman, 1998). Die Substitution T<sub>371</sub>A/S scheint eine Schlüsselrolle für die Entwicklung der Penicillinresistenz einzunehmen, ähnlich wie die T<sub>338</sub>A/G/P-Substitution in PBP2x, die ebenfalls direkt benachbart zum aktiven Serin ist. T<sub>371</sub> bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe des W<sub>368</sub>. Eine Substitution an der Position 371 führt zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindung und resultiert in einem Shift der Position des aktiven Serins, was zum Abfall der Acylierungseffizienz für Cefotaxim und Penicillin führt (Job et al., 2008). Die wichtige Rolle in der Penicillinresistenz der vier aufeinander folgenden Mutationen an Position 574-577 wurde ebenfalls oftmals in der Literatur beschrieben (Ferroni und Berche, 2001; Job et al., 2008; Sanbongi et al., 2004; Smith und Klugman, 1998; Smith und Klugman, 2003). Diese Substitutionen sind bei allen Mosaiksequenzen von PBP1a zu finden und die Reversion dieser Mutationen zeigte einen ebenfalls zu einem Abfall der Acylierungseffizienz für Cefotaxim und Penicillin (Job et al., 2008). Bei Uo5 PBP1a sind zudem die bekannten L<sub>583</sub>M, A<sub>585</sub>V und P<sub>432</sub>T-Substitutionen zu finden (Nichol et al., 2002; Sanbongi et al., 2004; Smith und Klugman, 1998).

Das Einbringen des Mosaik-PBP1a in P20 führte zu einer MHK für Cefotaxim von 1,5-2  $\mu$ g/ml und damit zu einem 3,8- bis 5-fachen Resistenzanstieg. Für das Resistenzpotential, das von PBP1a im genetischen Hintergrund von R6 mit Mosaik PBP2x vermittelt werden kann, ist entscheidend, ob die zwei Mosaikgene aus dem gleichen Klon sind und wie resistent der Donorstamm ist. So stieg die *pbp1a*-vermittelte MHK für Cefotaxim um das ca. 2-3-fache (Reichmann *et al.*, 1997; Schähle, 2005; Zerfass *et al.*, 2009) bzw. 8-16-fache an (Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1997). Für Penicilline wurde eine unterschiedliche Kreuzresistenz beobachtet: für Piperacillin waren die Transformanten mit einem MHK-Wert von 0,1  $\mu$ g/ml intermediär-resistent, während sie für Oxacillin mit 2  $\mu$ g/ml hochresistent waren.

Die hohe Resistenz für Cephalosporine der dritten Generation, zu denen auch Cefotaxim gehört, wird in *S. pneumoniae*-Isolaten offenbar nur durch Veränderungen von PBP2x und PBP1a erzielt (Coffey *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1997). Dies ist in den hier erhaltenen Transformanten bezüglich des Donorstammes *S. oralis* Uo5 nicht der Fall: keine der Transformanten erreichte dessen Resistenzniveau (Die MHK-Werte für Piperacillin und Oxacillin waren im Vergleich zu der Vorstufe lediglich um einen Faktor von entsprechend 1,7 und 1,3 erhöht). Dies gilt auch für Transformanten der weiteren Selektionsstufen, in denen wie in den folgenden Kapiteln besprochen, zum Teil die beteiligten Gene identifiziert werden konnten. Vermutlich führen zusätzliche Mutationen in PBP- und Nicht-PBP-Genen zur vollen Resistenz.

### 4.1.3 S. oralis PBP2b und die β-Laktam-Resistenz

Für die Entwicklung von hoher Penicillinresistenz ist neben PBP2x und PBP1a ein modifiziertes PBP2b besonders wichtig (Reichmann *et al.*, 1996; Smith und Klugman, 1998). Das liegt daran, dass PBP2b zwar keine Affinität gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation wie Cefotaxim besitzt (Hakenbeck *et al.*, 1987), aber eine hohe Affinität zu Penicillinen aufweist. In einer dritten Transformationsstufe mit chromosomaler *S. oralis* Uo5-DNA konnte daher mit Piperacillin als Selektionsantibiotikum PBP2b auf PC3 übertragen werden. In der sequenzierten Transformante PCP7 hatten die ersten 1350 Basen des Gens rekombiniert, was nur einen Teil der Transpeptidase-Domäne des Uo5-PBP2b darstellt; entsprechend waren 12 von insgesamt 52 Substitutionen in dieser Domäne vorhanden. Das Mosaik-PBP2b in PCP7 führte zu einer 25-30-fachen Erhöhung der Resistenz für Piperacillin, während die Oxacillin-MHK um das 10-12-fache im Vergleich zu der Vorstufe PC3 anstieg. Der hohe Anstieg der Piperacillinresistenz, von 0,1 µg/ml in der Vorstufe auf 2,5-3 µg/ml in PCP7 lässt sich damit erklären, dass PBP2b eine hohe Affinität für Piperacillin hat und somit ein primäres Target für dieses β-Laktamantibiotikum ist. Eine intermediäre Resistenz gegenüber Piperacillin wird alleine durch Modifikationen in diesem PBP vermittelt.

(Grebe und Hakenbeck, 1996). Der hohe MHK-Wert für Oxacillin von 20-24 µg/ml bestätigt die von Dowson *et al.*, 1994 beschriebene Beobachtung, dass eine hohe Oxacillinresistenz durch ein niederaffines PBP2x in Kombination mit einem modifizierten PBP2b erreicht wird, während für eine intermediäre Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum ein niederaffines PBP2x ausreicht (Dowson *et al.*, 1994). Erwartungsgemäß war die Cefotaximresistenz in der Transformante nicht erhöht; die MHK-Werte von 2-3 µg/ml sind nur gering erhöht bzw. liegen im gleichen Bereich wie die MHK-Werte der Vorstufe für Cefotaxim mit 1,5-2 µg/ml.

PBP2b aus S. oralis Uo5 besitzt in der Transpeptidase-Domäne mehrere Substitutionen, die bei resistenten Streptokokken-Stämme beschrieben wurden. Zwei sehr wichtige Mutationen für die Resistenzentwicklung sind die T<sub>446</sub>A/S-Substitution, direkt neben der SSN-Box und die E476G-Substitution. Diese zwei Mutationen sind in klinischen resistenten Stämmen vorzufinden und ihre Bedeutung für die β-Laktam-Resistenz wurde bereits in mehreren Studien diskutiert (Dowson et al., 1993; Dowson et al., 1989b; Ferroni und Berche, 2001; Nagai et al., 2002; Nichol et al., 2002; Sanbongi et al., 2004; Smith und Klugman, 1995). Die T<sub>446</sub>A-Substitution, die direkt im R6-Stamm mit Piperacillin selektioniert werden konnte (Grebe und Hakenbeck, 1996), führt zu einer 60 %-igen Reduktion der Affinität von PBP2b zu Penicillin G (Pagliero et al., 2004). In der Sequenz von PBP2b aus Uo5 ist auch ein Cluster von Mutationen um das KTG-Motiv zu finden, das in hoch-Penicillin-resistenten Stämmen vorkommt (du Plessis et al., 2002; Ferroni und Berche, 2001; Hakenbeck et al., 1998; Pagliero et al., 2004). In der untersuchten Transformante PCP7 jedoch ist der Uo5-Mosaikblock nur bis einschließlich der T<sub>446</sub>A-Substitution ausgetauscht und folglich spielen die Mutationen am C-terminalen Ende des Proteins keine Rolle bei dem beobachteten Resistenzphänotyp. Ob das Einbringen des kompletten Mosaikgens zu höheren Resistenzniveaus führt, bleibt zu klären. In der untersuchten Transformante sind neben der wichtigen T<sub>446</sub>A-Substitution noch zwei weitere bekannte Substitutionen vorhanden: S<sub>412</sub>P und Q<sub>438</sub>E zwischen dem SVVK- und SSN-Motiv. Diese wurden auch in resistenten Pneumokokken-Stämme, sowie bei dem hochresistenten S. mitis B6 gefunden (du Plessis et al., 2002; Hakenbeck et al., 1998; Pagliero et al., 2004).

Das *S. oralis* Uo5-*pbp2b* konnte auch als gereinigtes PCR-Produkt in den genetischen Hintergrund von R6 mit modifizierten PBP2x und MurE transformiert werden. Allerdings beschränkte sich der rekombinierte Bereich auf wenige Basen in der Transpeptidase-Domäne (bp 1239-1350). Dieser Austausch resultierte in 6 Aminosäure-Substitutionen zwischen dem ersten und zweiten konservierten Motiv in PBP2b (s. Abb. 3.15) und führte zu einer ca. 30-fachen Erhöhung der Piperacillin-Resistenz im Vergleich zu der durch Austausch von PBP2x und MurE vermittelten Resistenz. Mit einem Wert von 3 µg/ml konnte die MHK für Piperacillin des Stamms PCP7 erreicht werden, der zusätzlich ein modifiziertes PBP1a besitzt (Vergl. Tab. 3.18 und 3.20). Dieses Ergebnis zeigt nochmal deutlich, dass eine hohe Resistenz gegenüber Piperacillin durch Veränderungen in PBP2b und PBP2x erzielt wird. Im Gegensatz dazu zeigt der Stamm PCP(murE/2x/2b) eine viel niedrigere Resistenz gegenüber Oxacillin im Vergleich zu dem Stamm PCP7 (Vergl. Tab. 3.19 und 3.23). Das spricht dafür, dass Modifikationen in allen drei PBPs benötigt werden, um eine hohe Oxacillin-Resistenz zu erreichen. Die Cefotaxim-Resistenz der Transformante PCP(murE/2x/2b) steigt kaum an; dies ist nicht überraschend, da hier kein verändertes PBP1a vorliegt, welches dafür benötigt wird.

Die Transformation des amplifizierten *S. oralis pbp2b*-Fragments in R6 und R6 mit zuvor ausgetauschtem *murE* lieferte Transformanten mit niederaffinem PBP2b. Somit konnte gezeigt werden, dass PBP2b aus *S. oralis* Uo5 als erstes PBP ausgetauscht werden kann. Im R6 als genetischer Hintergrund wurde allerdings nur eine Transformante mit niederaffinem PBP2b erhalten. Das ausgetauschte PBP2b führte hier zu einem 5-fachen Anstieg der Piperacillin-Resistenz. Die Oxacillin-MHK blieb im gleichen Bereich wie die des Ausgangsstammes R6, während für Cefotaxim eine 2-fache Erhöhung zu beobachten war. Der Transfer dieser Mutation in den genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 wurde in der Literatur mit einem 2-fachen Anstieg der Piperacillin-Resistenz beschrieben. Einen Einfluss dieser Substitution auf die Cefotaxim- und Oxacillin-Resistenz wurde nicht beschrieben (Grebe und Hakenbeck, 1996). Da das niederaffine PBP2b nur die T<sub>446</sub>A-Substitution besaß, ist die Erhöhung der Piperacillin-Resistenz allein auf diese Mutation zurückzuführen.

Das Einbringen eines modifizierten PBP2b in R6 mit einem veränderten MurE führte zu einer 4-fachen Erhöhung der Piperacillin-Resistenz. Für Cefotaxim konnte kein Anstieg der Resistenz beobachtet werden. Auch die MHK-Werte für Oxacillin stiegen nur leicht an: von 0,08 µg/ml in dem Rezipienten auf 0,1 µg/ml in der Transformante (s. Tab. 3.19). Im Vergleich zum Ausgangsstamm R6 allerdings führte eine gleichzeitige Modifikation von MurE und PBP2b zu einem 20-fachen Anstieg der Piperacillin-Resistenz.

#### 4.1.4 Übertragung weiterer Resistenzdeterminanten

Durch drei weitere Transformationen mit chromosomaler Uo5-DNA und somit insgesamt sechs Transformationsstufen ausgehend von R6 konnte ein hochresistenter Stamm hergestellt werden, der allerdings immer noch nicht das Niveau von Uo5 besaß, besonders in Bezug auf Oxacillin und Piperacillin (s. Tab. 3.23). Insgesamt war für Cefotaxim und Piperacillin ein ca. 700-facher Anstieg der Resistenz zu vermerken, für Oxacillin wurde eine ca. 570-fache Erhöhung des Resistenzpotentials erreicht.

Die PBP-Profile der Transformanten der letzten drei Stufen lieferten keinen Hinweis auf PBP-Veränderungen außer den bereits beschriebenen PBP2x, PBP2b und PBP1a. Um feststellen zu können, welche Gene in der beobachteten Resistenzentwicklung involviert sind, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Allerdings konnten nur für wenige Gene signifikante Werte erhalten werden. Der Großteil davon sind hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion. Diese müssten gezielt durch Transformationsexperimente in nachfolgenden Versuchen auf ihr Resistenzpotential untersucht werden. Von allen in Tabelle 3.24 als signifikant aufgelisteten Genen war nur die Histidinkinase des Zwei-Komponenten-Systems 11 für ihre Rolle in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion dieses Zwei-Komponenten-Systems in Laborstämmen von *S. pneumoniae* zu einem Abfall der MHK für Piperacillin führte (Volz, 2008). Da MurE ein Protein ist, das in die Zellwandbiosynthese involviert ist, dem Angriffsort der  $\beta$ -Laktamantibiotika, und zudem der Einfluss von MurM als nicht-PBP-Gen in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz bekannt ist, konnte aus den, durch die Microarray-Analysen hervorgegangenen Daten allein *murE* als neue potentielle Resistenzdeterminante identifiziert werden. Der Beitrag von *murE* in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Welche zusätzlichen Gene zu dem Anstieg der β-Laktam-Resistenz in den Transformanten beigetragen haben bleibt zu klären. Durch die Microarray-Analysen können nicht alle ausgetauschten Gene identifiziert werden. Der Grund dafür ist, dass die entsprechenden Oligos nur einen kleinen Bereich des Gens abdecken. Wenn ein Gen nur zum Teil ausgetauscht ist und das Oligo in dem Bereich der nicht ausgetauschten Sequenz liegt, wird dieses Gen nicht als signifikant detektiert. Ähnlich, wird ein ausgetauschtes Gen bei der Microarray-Auswertung nicht sichtbar, wenn das Oligo in einem Sequenzbereich liegt, der bei beiden hybridisierten DNAs identisch oder sehr ähnlich ist. Es könnte somit sein, dass bei den vorhandenen Transformanten mehr Gene, auch solche, verantwortlich für den Resistenzphänotyp, übertragen wurden, die bei der Microarray-Auswertung nicht detektierbar waren. Auch Punktmutationen, die durch den Selektionsdruck hervorgerufen wurden, sind nicht auszuschließen. Die Sequenzierung der bekannten Genen ciaH, cpoA und *murM*, die in der nicht-PBP-vermittelten β-Laktam-Resistenz involviert sind, zeigte keine Veränderungen in diesen Genen. Die schlechte Transformationseffizienz bei den letzten drei Stufen spricht jedoch dafür, dass sich weitere Resistenzdeterminanten nicht transformieren liesen und möglicherweise lediglich Punktmutationen in Genen aufgetreten sind. Möglich wäre auch, dass ein Uo5-Gen im genetischen Hintergrund von R6 eine Resistenz nur in Verbindung mit anderen Uo5-Genen vermitteln kann.

Zusammenfassend konnte auch nach sechs Transformationsstufen die volle Resistenz des Donorstammes nicht übertragen werden. Zusätzlich zu den übertragenen *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a*, *murE* und Histidinkinase 11, scheinen mehrere Gene in die β-Laktam-Resistenz von Uo5 involviert zu sein. Es wurde z.B. bereits gezeigt, dass der Transfer von *S. oralis* Uo5 MurM ebenfalls zu einem Resistenzanstieg führt (Frohnweiler, 2009). Ob durch

nachfolgende Transformationen der Resistenzphänotyp von Uo5 zu erreichen ist, muss noch durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Bei der von Hakenbeck *et al.*, 1998 beschriebenen sukzessiven DNA-Transformation von *S. mitis* B6 in *S. pneumoniae* R6 konnte schon nach vier Transformationsstufen die volle Cefotaxim-Resistenz erreicht werden. Auch die Oxacillin- und Penicillin-MHKs der Transformanten lagen mit Werten von entsprechend 80-100 µg/ml und 40 µg/ml sehr nah an den MHK-Werten des Donors für diese Antibiotika (Oxacillin: 120 µg/ml, Penicillin: 50 µg/ml) (Hakenbeck *et al.*, 1998). Da allerdings *S. mitis* genetisch näher mit *S. pneumoniae* verwandt ist als *S. oralis* (Chi *et al.*, 2007), könnte diese größere genetische Distanz und die größeren Sequenzunterschiede zwischen *S. pneumoniae* und *S. oralis* der Grund dafür sein, dass bei vielen Genen die Möglichkeit zur homologen Rekombination nicht gegeben ist. So ist es z.B. nicht erstaunlich, dass das resistenzvermittelnde *murM*-Gen nicht übertragen werden konnte, da es im Genom von *S. oralis* Uo5 an einer anderen Stelle als im Genom von *S. pneumoniae* R6 liegt und sich somit die umgebende Sequenz sehr stark unterscheidet.

### 4.2 MurE: Eine neue Resistenzdeterminante

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von *murE* aus *S. oralis* Uo5, das hier eindeutig als neue Resistenzdeterminante für *S. pneumoniae* identifiziert werden konnte. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei MurE um ein Enzym, involviert in der Zellwand-Biosynthese, welches die ATP-abhängige Addition von L-Lysin an der wachsenden Peptidkette katalysiert.

### 4.2.1 β-Laktam-Resistenz, hervorgerufen durch verändertes MurE

Bereits in der ersten Transformationsstufe mit chromosomaler DNA aus *S. oralis* Uo5 konnte *murE* in *S. pneumoniae* R6 übertragen werden und führte zu einem Anstieg der Resistenz gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika. Dabei konnte zunächst unter Piperacillin-Selektion das Gen alleine oder zusammen mit *pbp2x* transferiert werden. Das modifizierte *murE* alleine führte zu einer Erhöhung der Cefotaxim- und Piperacillin-Resistenz. Einen deutlicheren Resistenzanstieg durch das modifizierte MurE konnte in Kombination mit niederaffinen PBPs beobachtet werden, unabhängig davon, ob solche Transformanten mit chromosomaler DNA oder mit gereinigten PCR-Produkten der spezifischen Gene erhalten wurden. In Verbindung mit Mosaik-PBP2x konnte der größte Resistenzanstieg bei Cefotaxim beobachtet werden (40-fach im Vergleich zum R6), aber auch die Oxacillin-MHK stieg deutlich an, um etwa das 21-fache (s. Tab. 4.1).

	Cefotaxim [µg/ml]	Piperacillin [µg/ml]	Oxacillin [µg/ml]
S. pneumoniae R6	0,01	0,01	0,07
R6+murE	0,03	0,04-0,05	0,08
R6+2x	0,2	0,02	0,4
R6+2x/murE	0,4	0,07	1,5
R6+2b	0,02	0,05	0,07
R6+2b/murE	0,03	0,2	0,1
R6+2x/2b	0,2-0,3	1-1,5	3-3,5
R6+2x/2b/murE	0,7	3	3-4,5

Tab. 4.1: MHK-Vergleich der Transformanten mit Austausch von MurE alleine,	und in
Verbindung mit Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b	

Der gleichzeitige Austausch von *murE* und *pbp2b* brachte den höchsten Anstieg in der Piperacillin-Resistenz (20-fach im Vergleich zum R6). In Tabelle 4.1 ist deutlich zu erkennen, dass durch den Austausch der Mosaik-PBP2x und/oder -PBP2b die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktame deutlich ansteigt, ein zusätzlich modifiziertes MurE jedoch erhöht diese Resistenz um einen Faktor von 2 bis 4. Das *murE*-Gen aus *S. oralis* Uo5 scheint somit eine wichtige Rolle in dem Resistenzphänotyp des Donors zu spielen. Die durchgeführten Experimente zeigten zudem, dass das modifizierte *murE* gut mit Piperacillin selektionierbar ist.

Erstaunlicherweise vermittelt nicht nur ein Austausch innerhalb des kodierenden Bereichs, sondern auch in der Promotorregion von *murE* eine Resistenz. Die Messung der Promotoraktivität von *murE* aus *S. pneumoniae* R6 und *S. oralis* Uo5 zeigte, dass der Promotor aus Uo5 eine 2- bis 2,5-fach stärkere Aktivität zeigt. Das Gen wird also tatsächlich stärker exprimiert und kann somit mehr Substrat umsetzen.

Mutationsanalysen mit murE sind nicht einfach durchzuführen, da das Gen essentiell ist. Daher war es notwendig, Stämme mit einer ektopischen Kopie von murE herzustellen, um nach anschließender Inaktivierung des Wildtyp-murE zu bestätigen, dass sowohl Veränderungen in dem Gen alleine als auch der Austausch der Promotoregion von murE für den Resistenzanstieg gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika verantwortlich sind. Dabei zeigte sich, dass diese Veränderungen im gleichen Ausmaß die β-Laktam-Resistenz beeinflussen. Der gleichzeitige Austausch von Promotor- und Gensequenz führte zu keiner Verstärkung dieses Effektes. Möglicherweise ist das modifizierte Enzym aktiver, was denselben Effekt hätte, wie eine erhöhte Expression. Unter der Annahme, dass das modifizierte MurE schneller und effizienter arbeitet bzw. in größeren Mengen vorhanden ist, könnte die komplette Mureinsynthese einen "Reaktionsschub" durchlaufen. Der Lysin-Rest würde schneller in die Peptidkette eingebaut werden, was möglicherweise zum Antrieb der nachfolgenden Reaktionen führt, so dass letztendlich dadurch eine potentiell erhöhte Bereitstellung von Muropeptiden erfolgen könnte. Dies wiederum könnte sich günstig auswirken unter Bedingungen, unter denen die Peptidoglykanbiosynthese angegriffen wird, d.h. in Gegenwart von β-Laktamen, sprich unter den hier angewendeten Selektionsbedingungen. In beiden Fällen (modifizierter Promotor oder Mutationen in der Gensequenz) scheint das Enzym jedoch eine Substratsättigung zu erreichen. Folglich kann der gleichzeitige Austausch der Promotor- und Gensequenz nicht weiter die Enzymaktivität verstärken und das Resistenzniveau kann demnach nicht weiter steigen. Ob für die erhöhte bzw. schnellere Bereitstellung von Muropeptiden die erhöhte Expression von anderen Zellwandenzymen benötigt wird, müsste noch überprüft werden, z.B. durch Messung der Menge bestimmter Proteine über Reporterplasmide.

2003 wurde von Gardete *et al.* eine Studie beschrieben, in der die Rolle von *murE* aus *S. aureus* gezeigt wurde. Hier wurde das untersuchte *murE* unter der Kontrolle eines IPTGinduzierbaren Promotors gesetzt, wobei bei steigender eingesetzter IPTG-Konzentration die Expression des Gens anstieg und die Wachstumsinhibierung durch Oxacillin abnahm. Die nachfolgenden Northern- und Western-Blot-Analysen von ausgewählten *S. aureus* Genen zeigten, dass ein stärker exprimiertes *murE* auf unbekannte Weise zu einer stärkeren Expression von *S. aureus pbp2a* und *pbpB* führt (Gardete *et al.*, 2003). Diese Beobachtung zur kontrollierten Expression von *pbp*-Genen durch *murE* konnte in *S. pneumoniae* nicht festgestellt werden. Sowohl die durchgeführten Western-Blot-Analysen als auch die Messung der Promotoraktivität von *pbp2x* haben gezeigt, dass das stärker exprimierte *murE* mit Promotor aus Uo5 keinen Einfluss auf die Expression der PBPs ausübt.

Der Mechanismus, mit dem *murE* die  $\beta$ -Laktam-Resistenz beeinflusst, ist zurzeit ungeklärt. Mehrere Gene, involviert in der Peptidoglykan-Biosynthese, wurden bereits in Verbindung mit  $\beta$ -Laktam-Resistenz beschrieben. Dazu gehört in Streptokokken-Isolaten das MurMN-Operon, dessen Genprodukte die Quervernetzung der Peptidketten katalysieren. Eine Inaktivierung des Operons führt zu einem Verlust der Penicillin-Resistenz, begleitet von einer Reduktion an verzweigten Muropeptiden. Es wird angenommen, dass ein funktionelles MurMN-Operon notwendig für die volle Expression der Penicillin-Resistenz ist (Filipe *et al.*, 2000; Filipe und Tomasz, 2000; Smith und Klugmann, 2001; Weber *et al.*, 2000). Weitere Zellwandproteine, involviert in der  $\beta$ -Laktam-Resistenz, mit Ausnahme der PBPs, konnten bisher nicht in Streptokokken identifiziert werden.

In *Staphylococcus aureus* dagegen wurde eine Reihe von Genen identifiziert, deren Funktion essentiell für eine vollständige Methicillin-Resistenz ist. Die meisten dieser Gene sind am Aufbau der Zellwand beteiligt und wurden als *fem* (<u>factors essential</u> for the expression of <u>methicillin</u> resistance) Faktoren bezeichnet. Die Funktionsfähigkeit der fem-Faktoren, zu denen auch *murE* und *murF* zählen, ist für die komplette Ausprägung der Methicillin-Resistenz notwendig. Durch Transposoninsertionen in resistenten Staphylokokken ließen sich Mutanten mit Inaktivierung von diesen Genen erzeugen, welche eine drastische Reduktion der Methicillin-Resistenz zeigten (Berger-Bächi *et al.*, 1992; de Lencastre und

Tomasz, 1994; Krnblum *et al.*, 1986). Wie genau jedoch all diese Zellwandproteine zu dem beobachteten Resistenzabfall führen ist noch unklar.

### 4.2.2 Suche nach resistenzrelevante Mutationen in murE

Die Veränderungen von murE im kodierenden Bereich, die in einigen Transformanten mit Resistenz in Verbindung gebracht werden konnten, beschränkten sich auf eine Region, die in MurE zu 15 Aminosäureaustauschen führt. Erstaunlicherweise sind diese Austausche nicht nur bei den hochresistenten S. mitis B6 (nicht aber in den sensitiven S. mitis M3 und 10712), sondern auch in S. pneumoniae 670 (Serotyp 6B), und den intermediär-resistenten S. pneumoniae PS2677 (Serotyp 23F-ST277) vorzufinden (s. Abb. 3.26). Dies lässt vermuten, dass MurE in diesen Stämmen das Produkt von horizontalem Gentransfer ist, wobei S. oralis als Donor fungiert. Um die möglichen Auswirkungen der Veränderungen dieser 15 Positionen zu überprüfen, wurden die homologen Positionen in der zur Verfügung stehenden 3D-Struktur von MurE aus E. coli betrachtet (Abb. 4.1). Das Protein besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen Domäne von AS 1-88; einer zentralen Domäne (AS 90-338), die an der Bindung von ATP beteiligt ist und einer C-terminalen Domäne (AS 340-497), die vermutlich an der Bindung zu der übertragenden Aminosäure beteiligt ist (Abb. 4.1). Das Produkt, UDP-NAc-Tripeptid bindet in der Spalte zwischen den drei Domänen (Gordon et al., 2001). Alle 15 Aminosäuren (AS 113-183 von MurE<sub>U05</sub>) liegen innerhalb der zentralen ATP-Binde-Domäne.



Abb. 4.1: 3D-Struktur von MurE aus E. coli

Dargestellt ist die dreidimensionale Molekülstruktur des MurE aus *E. coli.* Das Protein besitzt eine zentrale ATP-Binde-Domäne (rot) und eine N-terminale- (blau) sowie C-terminale-Domäne (grün). Die ATP-Binde-Domäne erstreckt sich zwischen Positionen 90 und 338. Innerhalb dieser Domäne liegt das konservierte ATP-Binde-Motiv GXXGKT. Die Aminosäuren dieses Motivs und deren Seitenketten sind weiß eingezeichnet. Markiert sind zudem die zwei Glycinreste in dem ATP-Binde-Motiv an Positionen 115 und 118. Die Molekülstruktur wurde mit dem Programm Deep View/Swiss-PdbViewer v3.7 generiert.

In Abbildung 4.2 ist ein Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur von MurE aus *E. coli* im Komplex mit dem Substrat UDP-NAc-L-Ala-D-Glu dargestellt. Eingezeichnet sind das ATP-Binde-Motiv, sowie die 15 gemeinsamen Positionen, an denen Aminosäureaustausche in den erhaltenen resistenten *S. pneumoniae* Transformanten vorkommen.



Abb. 4.2: Ausschnitt der 3D-Struktur von MurE aus *E. coli* in Komplex mit dem Substrat UDP-NAc-L-Ala-D-Glu

A: Dargestellt ist ein Ausschnitt der dreidimensionalen Molekülstruktur von MurE aus *E. coli* in Komplex mit dem Substrat UDP-NAc-L-Ala-D-Glu (lila). Eingezeichnet ist das ATP-Binde-Motiv GXXGKT (gekennzeichnet durch den Pfeil). Die Aminosäuren dieses Motivs und deren Seitenketten sind weiß eingezeichnet. Markiert sind zudem die zwei Glycinreste in dem ATP-Binde-Motiv an Positionen 115 und 118. Die Positionen der 15 gemeinsamen Aminosäure-Substitutionen, die in den erhaltenen Transformanten von *S. pneumoniae* vorkommen, sind dargestellt. Dabei sind die Aminosäuren und deren Seitenketten eingezeichnet, die an den entsprechenden Positionen im *E. coli*-Protein vorkommen (in weiß oder gelb).

B: Gezoomte Aufnahme von A unter einem anderen Blickwinkel.

Die Molekülstruktur wurde mit dem Programm Deep View/Swiss-PdbViewer v3.7 generiert.

Abbildung 4.2 lässt die Positionen erkennen, die in den S. *pneumoniae murE*-Transformanten verändert sind. In der Abbildung sind die Aminosäuren weiß gekennzeichnet, die eine große Distanz zum Substrat oder dem ATP-Binde-Motiv zeigen. Der Großteil der Substitutionspositionen in den vorhandenen *murE*-Mutanten und spielt wahrscheinlich keine Rolle bei der enzymatischen Reaktion. Sie könnten allerdings beispielsweise wichtig sein für die potentielle Interaktion mit anderen cytoplasmatischen Proteinen. Die ATP-Binde-Stelle ist bekannt, und sowohl Substrat als auch Produkt binden in der Spalte zwischen den drei Domänen. Daher ist es wenig wahrscheinlich, dass diese Aminosäuren, die sich auf der "Rückseite" bzw. seitlich der zentralen Domäne befinden, einen Einfluss auf die Bindung zu den Substraten ausüben. Vier Positionen jedoch liegen sehr nah an dem ATP-Binde-Motiv bzw. an der Bindestelle für UDP-NAc-L-Ala-D-Glu (gelb in Abb. 4.2) und könnten somit entscheidend die Enzymaktivität beeinflussen. Dazu gehört u.a. das T<sub>123</sub> in MurE<sub>*E. coli*, das sich in unmittelbarer Nähe des konservierten Motivs befindet. Die entsprechende Aminosäure ist in *S. pneumoniae* T<sub>126</sub> und ist in den Transformanten zu A<sub>126</sub> ausgetauscht. Auch die Positionen 155, 156 und 157 im *E. coli* MurE, die in den</sub> Transformanten A<sub>158</sub>S, L<sub>159</sub>F, T<sub>160</sub>S entsprechen, erscheinen wichtig für die enzymatische Reaktion. Die drei Aminosäuren an diesen Positionen liegen in der 3D-Struktur sehr nah am Substrat UDP-NAc-Dipeptid. Mutationen an diesen Stellen üben vermutlich einen Einfluss auf die Substratbindung aus.

## 4.3 Ausblick

#### Übertragung der β-Laktam-Resistenz von S. oralis auf S. pneumoniae

Die vorliegende Arbeit gibt einen ersten Einblick über die Rolle der Spezies *S. oralis* als Donor für die Entwicklung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz von *S. pneumoniae*. Durch sukzessive DNA-Transformation konnte ein großer Teil der  $\beta$ -Laktam-Resistenz, gemessen an den MHK-Werten, von dem hochresistenten Donorstamm auf *S. pneumoniae* übertragen werden. Weitere Transformationsversuche könnten klären, ob die volle Resistenz des Donors auch übertragbar ist. Falls das nicht möglich wäre, könnte das entweder an einer unzureichenden Homologie der entsprechenden Resistenzdeterminanten von *S. oralis* zu denen von *S. pneumoniae* liegen, und einer daraus resultierenden schwierigen Rekombination. Denkbar ist auch, dass der genomische Kontext von *S. oralis* bewirkt, dass bestimmte Komponenten nur in dieser Spezies Resistenz bewirken können, oder dass die Resistenz dort unterschiedlich ausgeprägt ist. Durch die gezielte Transformation der in dieser Arbeit nicht übertragenen PBPs könnte auch überprüft werden, ob diese tatsächlich keine Rolle für den  $\beta$ -Laktam-Resistenzphänotyp spielen.

Durch die Microarray-Analysen konnten keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden, welche Gene an der erhöhten Resistenz beteiligt waren, die bei den letzten Transformationsschritten erzielt werden konnte. Bekannt ist die Beteiligung von nur vier Proteinen (PBP2x, PBP1a, PBP2b, und MurE) an der beobachteten Resistenz. Um Aussagen über neue Resistenzdeterminanten zu treffen, könnten einige der bei der Microarray-Analyse aufgefallenen Gene in den Ausgangsstamm transferiert werden und auf ihre Relevanz für die  $\beta$ -Laktam-Resistenz überprüft werden. Durch die zunehmend preisgünstigere und schnelle Sequenzierung von Genomen könnte eine Sequenzierung der erhaltenen Transformanten klären, welche übertragenen Gene an der beobachteten Resistenz beteiligt waren, zumal die Genome sowohl von Rezipient (Hoskins *et al.*, 2001) als auch vom Donor (Abteilung Mikrobiologie, unveröffentlicht) bekannt sind.

#### MurE und die β-Laktam-Resistenz

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Rolle von MurE als Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* gezeigt werden. Da MurE ein essentielles Protein ist, das an der bakteriellen Zellwandbiosynthese beteiligt ist, stellt es ein attraktives Target für die Entwicklung neuer antimikrobielle Wirkstoffe dar. Demzufolge erscheint eine detaillierte Charakterisierung von MurE als Protein und Enzym sinnvoll zu sein. Bislang wurde *murE* nur in *S. aureus* als resistenzrelevantes Gen beschrieben, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt werden konnte. Es liegen keine Informationen über die Regulation der Zellwandbiosynthese vor. Durch einen Reporter-Assay könnte überprüft werden, ob die stäkere Expression von *murE* mit einer stärkeren Expression anderer Zellwandproteinen zusammenhängt. Eine solche Analyse könnte erste Hinweise auf das Zusammenspiel dieser cytoplasmatischen Enzyme geben und eine mögliche Hilfestellung bei der Aufklärung dieses bis jetzt unbekannten Mechanismus zur Resistenzentwicklung sein.

Enzymkinetische Studien des *S. oralis* MurE und seinen Derivaten, die die Resistenz offenbar vermitteln, und dem von *S. pneumoniae* sollten die Aminosäuren identifizieren, die für dieses Verhalten verantwortlich sind und klären, wie diese die Funktion von MurE beeinflussen. Diese Arbeiten könnten durch gerichtete Mutagenese komplementiert werden. In diese Versuche sollten auch die veränderten *murE*-Genen resistenter *S. pneumoniae* und von *S. mitis* B6 mit einbezogen werden, um abzuklären, ob auch dort tatsächlich MurE an der Resistenz beteiligt ist.

# 5 Zusammenfassung

Der erhebliche Anstieg an Penicillin-resistenten Bakterienstämmen stellt ein weltweit immer größer werdendes Problem in der Medizin dar. Für die Bekämpfung solcher resistenten Stämme ist es wichtig, die Entstehung und den Mechanismus der Penicillin-Resistenz auf molekularer Ebene zu verstehen und dadurch Targets für neue Klassen antimikrobieller Wirkstoffe zu identifizieren. Die Lösung dieser Problemstellung war somit der Schwerpunkt der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit.

Die Arbeit befasste sich mit der Übertragung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz von einem hochresistenten klinischen *S. oralis* Isolat aus Ungarn auf den sensitiven *S. pneumoniae* R6 Stamm. Dabei sollte durch Transformationsexperimente überprüft werden, ob und wie weit *S. oralis* als Donor für die Penicillin-Resistenz in *S. pneumoniae* fungieren kann und welche Gene dabei eine Rolle spielen. Solche Experimente bilden die Grundlage für das bessere Verständnis der Evolution und Ausbreitung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz in kommensalen und pathogenen Streptokokken.

Durch sukzessive DNA-Transformation konnte der Resistenzphänotyp des Donorstammes zu einem hohen Grad in den sensitiven *S. pneumoniae* Stamm R6 übertragen werden. Von Interesse war zunächst, welche *S. oralis* PBPs dabei eine Rolle spielen. Für die bekannten Resistenzdeterminanten PBP2x, PBP2b und PBP1a konnte nachgewiesen werden, dass sie auch hier einen entscheidenden Beitrag für die Resistenzentwicklung leisten. Nach insgesamt sechs aufeinanderfolgenden Transformationsstufen mit chromosomaler *S. oralis* DNA konnte das Resistenzniveau des Rezipienten ca. 600- bis 700-fach erhöht werden; PBPs waren nur bei den ersten drei Stufen beteiligt. Microarray-Analysen mit DNA der Transformanten gaben Hinweise darauf, welche anderen Gene übertragen wurden und erlaubten in einem Fall die Identifizierung einer neuen Resistenzdeterminante: MurE. Die gesamte Resistenz des Donors konnte nicht in *S. pneumoniae* übertragen werden; die Gründe hierfür sind denkbar vielfältig und wurden in der Diskussion aufgegriffen.

Die Charakterisierung der Nicht-PBP-Resistenzdeterminate MurE standen nach deren Identifizierung im Mittelpunkt der Analysen in der vorliegenden Arbeit. Die Selektion von β-Laktam-resistenten Transformanten mit modifiziertem MurE zeigten zum ersten Mal die Rolle dieses Proteins in der Entwicklung der Penicillin-Resistenz in *S. pneumoniae*. Austausche in diesem Gen führten zu einer ca. 3- bis 5-fachen Erhöhung der Resistenz gegenüber Cefotaxim und Piperacillin und bewirkten einen 40-fachen Anstieg der Cefotaxim-Resistenz und 20-fachen Anstieg der Oxacillin-Resistenz in Verbindung mit einem Mosaik-PBP2b führte das ausgetauschte MurE zu einem 20-fachen Anstieg der Piperacillin-Resistenz. Durch Herstellung von Stämmen mit ektopischer Kopie

von *murE* mit unterschiedlichen Promotor- und Genfragmenten und anschließender Deletion des Wildtyp-Allels im Genom konnte nachgewiesen werden, dass sowohl veränderte Bereiche im Strukturgen als auch der *murE*-Promotorbereich von *S. oralis* Uo5 zu einem Anstieg der Resistenz in *S. pneumoniae* führen. Einige der Veränderungen, die Aminosäuren betreffen, sind in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert und könnten die Bindung zum Substrat bzw. ATP beeinflussen.

Die Bestimmung der Promotoraktivität von *murE* aus *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 ergab, dass das Gen aus *S. oralis* etwa zweifach stärker exprimiert wird. Die stärkere Expression von *murE* hat allerdings keinen Einfluss auf die Produktion von PBP2x, PBP1a oder PBP2b, wie durch spezifische Antikörper und Western-Blots für alle drei PBPs festgestellt werden konnte. Dies konnte auch mit Hilfe von Reporter-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivität von *pbp2x* bestätigt werden. Signifikante Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung der *murE*-Transformanten konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Eine Hypothese geht davon aus, dass sowohl die erhöhte Promotoraktivität als auch die Mutationen im Strukturprotein dasselbe bewirken, nämlich die Bereitstellung von mehr MurE-Produkt (durch mehr Enzym oder durch aktiveres Enzym). Möglicherweise ist dadurch der Pool an Muropeptidvorstufen erhöht, was wiederrum Einfluss auf die Mureinbiosynthese hat und somit ein besseres Wachstum in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen erlaubt, d.h. unter den hier verwendeten Selektions- und Testbedingungen.

## 6 Literaturverzeichnis

Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob. Chemother.* **48 (1):** 5-16.

**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**(1**2)**: 1613-1620.

**Asahi Y. und Ubukata K. (1998).** Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumonia*. *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.

**Becker T. (2008).** Interspezies-Gentransfer zwischen *Streptococcus oralis* und *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

Bentley S. D., Aanensen D. M., Mavroidi A., Saunders D., Rabbinowitsch E., Collins M., Donohoe K., Harris D., Murphy L., Quail M. A., Samuel G., Skovsted I. C., Kaltoft 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.

Berger-Bächi B., Strässle A., Gustafson J. E. und Kayser F. H. (1992). Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother.* **36(7):** 1367-1373.

Birnboim H. C. und Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7(6): 1513-1523.

Bouhss A., Dementin S., Parquet C., Mengin-Lecreulx D., Bertrand J. A., Le Beller D., Dideberg O., van Heijenoort J. und Blanot D. (1999). Role of the ortholog and paralog amino acid invariants in the active site of the UDP-MurNAc-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD). *Biochemistry*. **38(38)**: 12240-12247.

Bouhss A., Mengin-Lecreulx D., Blanot D., van Heijenoort J. und Parquet C. (1997). Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli.Biochemistry*. **36(39):** 11556-11563.

Bouhss A., Trunkfield A. E., Bugg T. D. und Mengin-Lecreulx D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 208-233.

Bowers E. F. und Jeffries L. R. (1955). Optochin in the identification of *Streptococcus* pneumoniae. J Clin Pathol 8(1): 58-60.

**Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziples of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254.

Bridge P. D und Sneath P. H. (1983). Numerical taxonomy of Streptococcus. J Gen Microbiol. 129(3): 565-597.

**Brown J. H. (1919).** The use of blood agar for the study of streptococci. *Monograph No. 9.* The Rockefeller Institute for Medical Research, New York

**Carapito R., Chesnel L., Vernet T. und Zapun A. (2006).** Pneumococcal β-lactamresistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. *J Biol Chem* **281(3):** 1771-1777.

Chalkley L. J. und Koornhof H. J. (1990). Intra- and inter-specific transformation of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin resistance. *J Antimicrob Chemother*. **26(1)**: 21-28.

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. 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  $\beta$ -lactams of resistant strains. *J Biol Chem* **278(45)**: 44448-44456.

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.

Chung C. T., Niemela S. L. und Miller R. H. (1989). One-Step Preparation of Competent *Escherichia Coli*: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2172-2175.

**Cleveland W. S. (1979).** Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc* **74:** 829-836.

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**: 1306-1313.

**Coffey T. J., Dowson C. G., Daniels M. und Spratt B. G. (1993).** Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis.* FEMS Microbiol Lett. **110(3):** 335-339.

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.

**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.

de la Campa A. G., Ardanuy C., Balsalobre L., Pérez-Trallero E., Marimón J. M., Fenoll A. und Liñares J. (2009). Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis.* **15(6):** 905-911.

**de Lencastre H. und Tomasz A. (1994).** Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother.* **38(11):** 2590-2598.

**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.

**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. USA* 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., 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.

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. (1999). Application of *pbp1A* PCR in identification of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. **37(3)**: 628-632.

**Dupont P., Aubry A., Cambau E. und Gutmann L. (2005).** Contribution of the ATP binding site of ParE to susceptibility to novobiocin and quinolones in *Streptococcus pneumoniae. J Bacteriol.* **187(4):** 1536-1540.

El Zoeiby A., Sanschagrin F. und Levesque R. C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors.*Mol Microbiol.* **47(1):** 1-12.

**Eriksen K. R. (1945).** Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type 1. *Acta Pathol Microbiol Scand* **22:** 398-401.

**Eveland S. S., Pompliano D. L. und Anderson M. S. (1997).** Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. *Biochemistry.* **36(20):** 6223-6229.

**Falk P. J., Ervin K. M., Volk K. S. und Ho H. T.(1996).** Biochemical evidence for the formation of a covalent acyl-phosphate linkage between UDP-N-acetylmuramate and ATP in the *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate:L-alanine ligase-catalyzed reaction. *Biochemistry.* **35(5):** 1417-1422.

Fenoll A., Martin-Bourgon C., Muñoz R., Vicioso D. und Casal J. (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.* **13(1):** 56-60.

**Ferroni A. und Berche P. (2001).** Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children. *J Med Microbiol.* **50(9):** 828-832.

Filipe S. R., Severina E. und Tomasz A. (2000). Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. **182(23)**: 6798-6805.

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.

Frère J. M., Ghuysen J. M. und Iwatsubo M. (1975). Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur. J. Biochem.*, **57(2):** 343-351.

**Frohnweiler K. (2009).** Überexpression und Reinigung von MurM und Untersuchung seiner Rolle bei der Vermittlung von beta Lactam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

**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.

Gardete S., Ludovice A. M., Sobral R. G., Filipe S. R., de Lencastre H. und Tomasz A. (2004). Role of *murE* in the Expression of beta-lactam antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus.J Bacteriol.* **186(6):** 1705-1713.

**Ghuysen J. M. (1991).** Serin β-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45:** 37-67.

Gillner D. M., Bienvenue D. L., Nocek B. P., Joachimiak A., Zachary V., Bennett B. und Holz R. C. (2009). The *dapE*-encoded N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase from *Haemophilus influenzae* contains two active-site histidine residues. *J Biol Inorg Chem.* 14(1): 1-10.

**Glauner B. (1988).** Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **172:** 451-464.

**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.

González I., Georgiou M., Alcaide F., Balas D., Liñares J. und de la Campa A. G. (1998). Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group *streptococci*. *Antimicrob Agents Chemother*. **42(11)**: 2792-2798.

Gordon E., Flouret B., Chantalat L., van Heijenoort J., Mengin-Lecreulx D. und Dideberg O. (2001). Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **276(14)**:10999-11006.

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.

**Grebe T. und Hakenbeck R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(4):** 829-834.

**Grebe T., Paik J. und Hakenbeck R. (1997).** A novel resistance mechanism against  $\beta$ -lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol* **179(10):** 3342-3349.

Griffith F. (1928). The significance of pneumococcal types. J Hyg 27: 113-159.

Guenzi E., Gasc A. M., Sicard M. A. und Hakenbeck R. (1994). A two-component signaltransducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12(3)**: 505-515.

**Hakenbeck R. (1995).** Target mediated resistance to β-lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* **50**: 1121-1127.

Hakenbeck R., Briese T. und Ellerbrok H. (1986). Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem* **157**: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., Zähner D. und Stock J. B. (1999). Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33(4)**: 673-678.

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-*M<sub>r</sub>* penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumonia*. *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., 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., Hakenbeck, R. und Brückner, R. (2007). A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**: 217-224.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hansman D. und Bullen M. M. (1967). A resistant pneumococcus. *The Lancet* **7509**: 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.

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.

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., Gaustad P., Nes I. F. und Morrison D. A. (1996). Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol Microbiol.* **21(4)**: 863-869.

Hayashi K. (1975). A rapid determination of sodium dodecyl sulphate with methylene blue. *Anal. Biochem.* 67: 503-506.

Hoskins J., Alborn W. E., Jr., Arnold J., Blaszczak 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., McHen-ney 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.

**Ikeda M., Wachi M., Jung H. K., Ishino F. und Matsuhashi M. (1990).** Homology among MurC, MurD, MurE and MurF proteins in *Eschericha coli* and that between *E. coli* MurG and a possible MurG protein in *Bacillus subtilis.J Gen Appl Microbiol* **36:** 179-187.

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.

Job V., Carapito R., Vernet T., Dessen A. und Zapun A. (2008). Common alterations in PBP1a from resistant *Streptococcus pneumoniae* decrease its reactivity toward beta-lactams: structural insights. *J Biol Chem.* **283(8)**: 4886-4894.

Joris B., Ghuysen J. M., Dive G., Renard A., Dideberg O., Charlier P., Frère J. M., Kelly J. A., Boyington J. C. und Moews P. C. (1988). The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family. *Biochem J.* **250(2)**: 313–324.

Karita M., Etterbeek M. L., Forsyth M. H., Tummuru M. K. und Blaser M. J. (1997). Characterization of *Helicobacter pylori dapE* and construction of a conditionally lethal *dapE* mutant. *Infect Immun.* **65(10):** 4158-4164.

**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.

Kell C. M., Sharma U. K., Dowson C. G., Town C., Balganesh 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.

**Kilian M., Mikkelsen L. und Henrichsen J. (1989).** Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov., and emended description of *Streptococcus sanguinis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982) and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int J Syst Bacteriol* **39:** 471-484.

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.

**Kilpper-Bälz R., Wenzig P. und Schleifer K. H. (1985).** Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis*. Int J Syst Bacteriol **35:** 482-488

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.

Klugman K. P. (1990). Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 3: 171-196.

Klugman K. P. und Koornhof H. J. (1988). Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. *J. Infect. Dis.* **158(5):** 956-964.

Kornblum J., Hartman B. J., Novick R. P. und Tomasz A. (1986). Conversion of a homogeneously methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogeneous resistance by Tn*551*-mediated insertional inactivation. *Eur J Clin Microbiol.* **5(6):** 714-718.

**Krauß J. und Hakenbeck R. (1997).** A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillinbinding 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*. *Microbial Drug Resist.* **2:** 183-186.

Lacks S. und Hotchkiss R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta.* **39**: 508-518.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Laible G. und Hakenbeck R. (1987). Penicillin-binding proteins in beta-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., 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.

Lancefield R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.

**LeBlanc D. J., Lee L. N. und Inamine, J.M. (1991).** Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis. Antimicrob. Agents Chemother.* **35 (9):** 1804-1810.

Ludovice A. M., Wu S. W. und de Lencastre H. (1998). Molecular cloning and DNA sequencing of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase (*murE*) gene, essential for the optimal expression of methicillin resistance.*Microb Drug Resist.* **4(2)**: 85-90.

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.

**Marmur J. (1961).** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3:** 202-218.

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.

Marton A., Gulyas M., Muñoz R. und Tomasz A. (1991). Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J. Infect. Dis.* **163(3):** 542-548.

**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  $\beta$ -lactam resistance. *J Bacteriol* **188(5)**: 1959-1968.

**Mengin-Lecreulx D., Blanot D. und van Heijenoort J. (1994).** Replacement of diaminopimelic acid by cystathionine or lanthionine in the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176:** 4321-4327.

Mengin-Lecreulx D., Falla T., Blanot D., van Heijenoort J., Adams D. J. und Chopra I. (1999). Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramoyl- L-alanyl-D-glutamate:L-lysine ligase in *Escherichia coli* and effects on peptidoglycan biosynthesis and cell growth. *J Bacteriol.* 181(19): 5909-14.

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 352-355.

Mitchell, T. J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* **1(3):** 219-230.

Mitchell, T. J., Alexander, J. E., Morgan, P. J. und Andrew, P. W. (1997). Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **26**: 62S-71S.

Morlot C., Noirclerc-Savoye M., Zapun A., Dideberg O. und Vernet T. (2004). The D,Dcarboxypeptidase 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 pneu-moniae*. *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.

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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactam antibiotics in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95(23)**: 13403-13406.

Muñoz R., Coffey T. J., Daniels M., Dowson C. G., Laible G., Casal J., Hakenbeck R., Jacobs M., Musser J. M. und Spratt B. G. (1991). Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis.* **164(2)**: 302-306.

Muñoz R., Dowson C. G., Daniels M., Coffey T. J., Martin C., Hakenbeck R. und Spratt B. G. (1992). Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol.* **6(17):** 2461-2465.

**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.

Nichol K. A., Zhanel G. G. und Hoban D. J. (2002). Penicillin-binding protein 1A, 2B and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistent *Streptococcus pneumonia*. *Antimicrob Agents Chemother* **46(10)**: 3261-3264

**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., Croizé J., Dideberg O., Vernet T. und Di Guilmi A.
M. (2004). Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-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 Mi-crobiol* **45(4)**: 1225-1233.

**Pasteur L. (1881).** Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de larage. *Bull Acad Méd* **10:** 94-103.

Patterson M. J. (1991). *Streptococcus. In* Medical Microbiology. Baron, S. (Hrsg.). Churchill Livingstone, New York, USA.

**Perichon B., Tankovic J. und Courvalin P. (1997).** Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **41(5):** 1166-1167.

**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 Penicillinbindenden Proteine in *S. pneumoniae* R6, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

**Potgieter E. und Chalkley L. J. (1991).** Reciprocal transfer of penicillin resistance genes between *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitior* and *Streptococcus sanguis*. *J Antimicrob Chemother*. **28(3):** 463-465.

**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.

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): 177-81.

**Rosenbach F. J. (1884).** Mikroorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. *J.F. Bergmann*, Wiesbaden

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 (2nd ed.), CSH Press, New York.

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 pneumonia* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **48(6)**: 2244-2250.

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-5467.

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.

Schähle Y. (2005). Selektionierbarkeit und Gentransfer von PBP1a in *Streptococcus pneumoniae*. 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 7-16.

**Schnorpfeil A. (2010).** Die Rolle der Histidinkinase CiaH, im Zwei-Komponenten-System CiaRH, in *Streptococcus pneumoniae*.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 penicillinbinding protein 3. *J Bacteriol* 172(11): 6499-6505.

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.

**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.

Smith A. M. und Klugman K. P. (1995). Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **39(4)**:859-867.

Smith A. M. und Klugman K. P. (1998). Alterations in PBP 1A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1329-1333.

Smith A. M. und Klugman K. P. (2001). Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45(8)**: 2393-2396.

Smith A. M. und Klugman K. P. (2003). Site-specific mutagenesis analysis of PBP1a from a penicillin-cephalosporin-resistant pneumococcal isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 387-389.

Smith A. M. und Klugman K. P. (2005). Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level  $\beta$ -lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49(11)**: 4622-4627.

**Sternberg G. (1881).** A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injections of human saliva. An experimental research. National Board of Health Billetin **2**: 781-783.

**Štrancar K., Boniface A., Blanot D. und Gobec S. (2007).** Phosphinate inhibitors of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: L-lysine ligase (MurE). *Arch Pharm* (Weinheim). **340(3):** 127-134.

Strominger J. L., Izaki M., Matguhashi M. und Tipper D. J. (1967). Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Fed. Proc.* **26** (1): 9-22.

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 pneumonia*. *Nucleic Acids Res.* **30(14)**: 3152-3162.

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. USA* 54(4): 1133-1141.

**Tomasz A. (1979).** The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the  $\beta$ -lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* **33:** 113-117.

Tomasz A. und Hotchkiss R. D. (1964). Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc Natl Acad Sci* USA 51: 480-487.

**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.

**Volz C. (2008).** Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie Piperacillin-resistenter Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

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 beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett.* **188(1):** 81-85.

Weidel W. und Pelzer H. (1964). Bagshaped macromolecules- a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 26: 193-232.

Whiley R. A und Beighton D. (1998). Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 13(4): 195-216.

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.

**Zähner D. (1999).** Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zweikomponentensystems *cia* von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

**Zerfass I. (2010).** PBP2x-Mutationen in *Streptococcus pneumoniae*: Auswirkungen auf β-Laktam-Resistenz und Zellphysiologie. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

Zerfass I., Hakenbeck R. und Denapaite D. (2009). An important site in PBP2x of penicillinresistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: mutational analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother.* **53(3):** 1107-1115.

Zhao G., Meier T. I., Kahl S. D., Gee K. R. und Blaszczak L. C. (1999). BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(5):** 1124-1128.
## 7 Anhang



Abb. 7.1: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein

Legende siehe nächste Seite



Abb. 7.2: Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein

Gezeigt ist das Chromatogramm (HPLC-Elutionsprofil) von R6, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) für die Analyse der Muropeptide aus dem Murein. 1 L-Kulturen in C-Medium wurden bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wachsen gelassen, die gewonnene Zellwand mit Fluorwasserstoffsäure und Cellosyl 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. 7.2 den Nummern Strukturen zugeordnet sind. Zu beachten ist, dass eine Auftrennung von Peak 2 und 3 nicht erzielt werden konnte.

mAU: milli Absorbance Units

1	2	3	4	5		6		7	8
G-M-G-M	G-M 1-Ala p-iGlu 1-Lys	G*-M 1-Åla 1-iGlu 1Lys	G-M L-Åla D-iGln L-Lys	G*-M 1-Ala p-iGln 1-Lys	G-M L-Ala D-iGln L-Lys – L	Of -Ala	G-M 1-Ala p-iGln 1-Lys p-Ala	G-M L-Ala D-iGlu L-Lys-L-Ser-L-Ala	G-M L-Ala D-iGin L-Lys p-Ala
	Tri[Glu]	Tri[Glu/deAc	:] Tri	Tri[deAc]	Tri(A	.)	Tetra	Tri(SA)[Glu]	<sup>Gly</sup> 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=1-Ser	G-M(OAc) L-Åla D-iGln L-Lys	G*-M I L-Ala D-iGlu L-Lys=1-Ser -	G-M I I-A D-iC J -L-Ala L-D D-A	la Fln 75—L-Ala la	G-M L-Ala D-iGln L-Lys-	-t-Ser -t-Ala	G*-M I L-Ala D-iGln L-Lys=L-Ser -L-Ala	G-M I L-Ala D-iGln I-Lys=L-Ala=L-Ala
Penta	Tri(S)	Tri[OAc]	Tri(SA)[Glu	/deAc] Tet	ra(A)	Tı	ri(SA)	Tri(SA)[deAc]	Tri(AA)
10	6	17		18		19		20	21
G-M L-Ala D-iGlu L-Lys Tetra Tri[	G-M L-Åla D-iGln L-Lys D-Åla Glu]‡ T	G-M G*-M L-Åla D-iG D-iGlu L-Ly L-Lys D-Å	la in r is p la r eAc]‡ Te	G-M M L-Ala -Ala D-iGin -iGin L-Lys -Lys D-Ala etra Tri[-G] <sup>‡</sup>	G-M L-Ala D-IGI L-Lys Te	G-M 1-Ala a p-iGh n 1-Lys s p-Ala tra Tri	G*-N L-A D-iC L-L-T	G-M 4 L-Åla G-M Lla p-iGln L-Ål Gln L-Lys p-iG ysp-Åla L-Ly Tri[deAc]‡ 7	G-M L-Ala a D-iGin in L-Lys s-L-Ser-L-Ala-D-Ala Fetra (SA)Tri
	22			23				24	25
M L-Ala D-iGlu L-Lys-L-J	G-M L-A D-IC L-L Ala-1-Ala-D-A	la G-M iln L-Ala /s D-iGln la L-Lys-L-	G-M I-A D-IC I-L L-L Ala=L-Ala —D-A	l () la G-M Jln L-Ala ys D-IGIn la L-Lys—	3-M L-Ala D-iGIn L-Lys—L-Se J-Ala	r –ı-Ala	G*-M IL-Ala D-iGln L-Lys -L-	G-M L-Ala D-iGin L-Lys Ser –L-Ala –D-Ala	Ac G-M G-M L-Ala L-Ala D-iGIn D-iGIn L-Lys L-Lys—D-Ala
Tetra Tri(	AA) <sup>‡</sup> [Ghu/-0	G]‡ Tet:	ra(AA)Tri	Tetra	Tri(SA)		Tetra(S.	A)Tri[deAc]‡	Tetra Tri[OAc]‡
		26						27	
G-M L-Ala D-iGln L-Lys-L-Sen	G-M L-Åla D-iGh L-Lys- r-L-Ala-D-Åla	G-M L-A L-Ser –L-Ala D-ir L-L	f Ula Gln ys—L-Ser—L-Ali	G-M L-Ala p-iGln L-Lys-L-Ala-L a-p-Ala	-Ala	G*-M I L-Ala D-iGln L-Lys-	-L-Ala-L-Ala	G-M t-Ala G*-M p-iGln t-Ala t-Lys p-iGln -p-Ala t-Lys-t-	G-M L-Åla D-iGin L-Lys Ser –L-Ala–D-Åla
Tet	ra(SA)Tri(S	A)	Tetra Tri(	AA)‡(SA)‡		Tetra	a Tri(AA)‡	[deAc]‡ Tetra]	ſri(SA)‡[deAc]‡



Legende siehe übernächste Seite



Abb. 7.4: Strukturen der in der Zellwand von R6, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) detektierten Muropeptide

Legende siehe nächste Seite

	35			
G-M G-M I-Ala G*-M I-Ala D-iGIn I-Ala D-iGIn I-Lys D-iGIN I-Lys D-iGIN I-Lys I-Lys-I-Ala-I-Ala-D-Ala	G-M G-M L-Ala I D-iGln L-Ala D-iGln I D-iGlu I-Lys-L-Ala-L-Ala L-Lys-L-Ala-L-Ala-D-Ala	G-M I LAla Ac G-M D-iGln G-M L-Jys I L-Jys L-Ala D-iGln I A-D-Ala D-iGln L-Jys-L-Ser -1 L-Jys-L-Ser -L-Ala-D-Ala	G-M I L-Ala D-iGin L-Lys L-Ala–D-Ala	
Tetra Tetra Tri(AA)[Glu/deAc] <sup>‡</sup>	Tetra Tetra Tri(AA) <sub>2</sub> ‡[Glu]‡	Tetra Tetra Tri(SA) <sub>2</sub> ‡[OA	lc]‡	
	35	36		
G-M G-M I-Ala I-Ala D-iGiu D-iGiu L-Lys-L-Ser-L-Ala L-Lys-L-Ala-L-Ala	G-M G-M I-Ala G*-M L-Ala D-iGin L-Ala D-iGin L-Lys D-iGin L-Lys D-iAla L-Lys-L-Ala-L-Ala-D-Ala	G G-M I G-M L-Ala D L-Ala D-iGIn L D-iGIn L-Lys-L-Ser -L-Ala-D L-Lys-L-Ala-L-Ala-D-Ala	-M ⊥,-Ala ⊢iGln ⊥Lys–L-Ser –L-Ala ↓ ↓Ala	
Tetra Tri(AA) <sup>‡</sup> (SA) <sup>‡</sup> [Gh <sub>2</sub> ]	Tetra Tetra Tri(AA)[deAc]‡	Tetra Tetra Tri(AA) <sup>‡</sup> (SA) <sub>2</sub> <sup>‡</sup>		

## Abb. 7.5: Strukturen der in der Zellwand von R6, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) detektierten Muropeptide

Aufgelistet sind die Strukturen aller in der Zellwand von R6, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) mittels LTQ-FT-Massenspektrometrie detektierten reduzierten Muropeptide. Die Zahlen über den Strukturen geben die jeweilige Position der Peptide im HPLC-Elutionsprofil an (= Peaknummern). Die Bezeichnung der Muropeptide befindet sich jeweils unterhalb der entsprechenden Struktur, wobei bei einigen Eluaten mehrere Strukturen möglich sind. Diese sind unter der jeweiligen Zahl aufgeführt. 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 durch die Abkürzung OAc gekennzeichnet. Die Buchstaben A, AA und SA in den Strukturbezeichnungen weisen auf die Zusammensetzung der Interpeptidbrücken hin.

A: Alanin; AA: 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, R6(murE), R6(2x), R62xmurE und R6(2x/murE) 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. In der letzten Zeile ist die Menge des wiedergewonnenen Gesamtpeptidmaterials aufgeführt. Anzumerken ist, dass bei allen Stämmen eine Auftrennung von Peak 2 und 3, sowie von Peak 35 und 36 bei R6 nicht möglich war.

	Peakfläche [%]					
Peak Nr.	R6	R6 (murE)	R6 (2x)	R6 2x/murE	R6 (2x/murE)	
1	3,01	2,65	2,39	2,80	2,58	
2/3	2,18	3,10	1,90	2,21	1,83	
4	23,53	19,09	19,92	20,83	19,97	
5	2,20	3,43	4,77	5,13	2,87	
6	3,27	2,50	3,46	2,21	2,08	
7	0,56	0,37	0,40	0,41	0,60	
8	1,46	1,08	1,14	1,06	0,98	
9	3,73	3,01	3,92	3,49	3,53	
10	0,95	0,74	0,89	0,84	0,90	
11	1,11	0,78	0,90	0,94	0,99	
12	0,71	0,63	0,67	0,70	0,67	
13	4,55	3,17	3,91	3,52	4,97	
14	0,66	0,48	0,58	0,58	1,15	
15	1,64	1,15	1,31	1,15	1,95	
16	0,82	0,88	0,88	0,98	0,74	
17	0,64	0,75	0,77	0,88	0,54	
18	1,06	0,94	0,97	1,12	0,51	
19	11,01	9,97	8,22	9,21	6,14	
20	0,57	1,61	1,77	2,21	0,98	
21	6,62	6,61	6,90	7,11	5,84	
22	0,98	0,94	0,85	0,65	0,98	
23	4,89	3,06	2,92	2,33	3,40	
24	1,28	1,69	2,26	1,47	1,36	
25	1,27	1,36	0,98		1,36	
26	2,35	2,49	2,77	2,26	3,07	
27	1,80	2,24	2,19	2,25	1,95	
28	1,70	1,42	1,63	1,36	2,21	
29	0,52	0,91	0,52	0,65	0,67	
30	0,71	0,77	0,50	0,67	1,08	
31	0,80	0,91	0,63	0,87	0,73	
32	0,40	0,51	0,21	0,31	1,29	
33	1,17	1,38	1,18	1,05	1,42	
34	0,33	0,52	0,54	0,72	0,66	
35	0,27	0,46	0,63	0,75	0,80	
36		0,30	0,74	0,73	0,67	
Summe	88,77	81,91	84,23	83,43	81,47	

### Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die herzliche Aufnahme in der Abteilung, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sowie die vielzähligen Anregungen und Ideen. Vielen Dank außerdem für das große Interesse am Verlauf meiner Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Aufmunterung.

Herrn Prof. Dr. John A. Cullum danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Einen herzlichen Dank möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Patrick Maurer für die großartige Betreuung, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge aussprechen. Vielen Dank für die Motivation und das stets offene Ohr.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Reinhold Brückner für die wertvollen Diskussionen und vielzähligen Anregungen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Waldemar Vollmer und seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit in ihrem Labor während meines Aufenthalts in England. Ein besonderer Dank geht hierbei an Herrn Dr. Khai Bui für die Betreuung bei der Zellwand-Präparation und -Analyse.

Allen Laborkollegen danke ich für die Unterstützung, gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre. Mein Dank geht hierbei vor allem an Ulrike Klein, Brigitte Rosenberg und Brigitte Schlegler, mit deren Hilfe ein reibungsloser Laboralltag ermöglicht wird

Danke Yvonne, Ilka und Michèle für die unzähligen unterhaltsamen Stunden im und außerhalb des Labors. In stressigen Situationen habt Ihr mich immer unterstützt, konntet mich aufmuntern und zum Lachen bringen. Danke vielmals! Ohne Euch hätte die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht! Kathi und Patrick Marx, Danke für Eure Hilfe und die vielen lustigen Stunden, nicht nur im Labor!

Ein großes Dankeschön an meine Familie, die mich, trotz der Entfernung, immer und in allem unterstützt hat. Ohne meine Eltern wäre ich nie so weit gekommen.

Zum Schluss ein riesiges Dankeschön an Dich Thorben, für die liebevolle Unterstützung und unendliche Geduld! Danke für dein Verständnis und deine Liebe, gerade in den letzten Monaten der Promotion, in denen ich teilweise unausstehlich war! Deine ständige Unterstützung und Motivation hat mir die notwendige Kraft zum Fertigstellen dieser Arbeit gegeben.

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name:	Katya Todorova
Geburtsdatum:	11.05.1981
Geburtsort:	Burgas, Bulgarien
Familienstand:	Ledig
Staatsangehörigkeit:	Bulgarisch

#### Schulausbildung

1987-1994	Grund- und Mittelschule Vela Blagoeva, Burgas, Bulgarien
1994-1999	Goethe Gymnasium, Burgas, Bulgarien
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### Hochschulausbildung

10/1999-07/2001	Studium der angewandten Informatik, TU Kaiserslautern
10/2001-02/2007	Studium der Biologie, TU Kaiserslautern
	Abschluss: Diplom
	<u>Hauptfach:</u> Mikrobiologie
	Thema der Diplomarbeit:
	Untersuchungen von Domänenstrukturen von
	Penicillin-bindenden-Proteinen
05/2007-08/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion am Lehrstuhl
	für Mikrobiologie der TU Kaiserslautern
	Thema der Promotion:
	β-Laktam-Resistenz in <i>Streptococcus</i> spp.: Eine neue
	Resistenzdeterminante murE