

# **PBP2a als Resistenzdeterminante in Labormutanten und klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae***

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

von

**Dipl.-Biol. Jens Rutschmann**

Datums der wissenschaftlichen Aussprache: 8. April 2011

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Burkhard Büdel  
1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck  
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John Cullum

Kaiserslautern, 2011

D 386



Hiermit bestätige ich, Jens Rutschmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, daß ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 09.02.2011



# I. Inhaltsverzeichnis

|  | Seite     |
|--|-----------|
| I. Inhaltsverzeichnis  | 1         |
| II. Zusammenfassung  | 4         |
| III. Abkürzungsverzeichnis   | 6         |
| <br>   |           |
| <b><u>1. Einleitung</u></b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>                         | <b>8</b>  |
| <b>1.2 <math>\beta</math>-Lactam-Resistenz</b>                     | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Penicillin-bindende Proteine</b>                            | <b>11</b> |
| <b>1.4 Cefotaxim-resistente Labormutanten</b>                      | <b>13</b> |
| <b>1.5 PBP2a</b>   | <b>14</b> |
| <b>1.6 Das signaltransduzierende Zwei-Komponenten-System CiaRH</b> | <b>15</b> |
| <b>1.7 Zielsetzung dieser Arbeit</b>                               | <b>17</b> |
| <br>   |           |
| <b><u>2. Material</u></b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1 Stämme</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.2 Nährmedien</b>  | <b>20</b> |
| <b>2.3 Vektoren</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.4 Oligonukleotidprimer</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>2.5 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits</b>                    | <b>26</b> |
| <br>   |           |
| <b><u>3. Methoden</u></b>  | <b>28</b> |
| <b>3.1 Mikrobiologische Methoden</b>                               | <b>28</b> |
| 3.1.1 Glycerin-Dauerkulturen                                       | 28        |
| 3.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen                                | 28        |
| 3.1.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)             | 28        |
| 3.1.4 Präparation chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i>       | 29        |
| 3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>               | 30        |
| 3.1.6 Transformation von <i>S. pneumoniae</i>                      | 31        |
| 3.1.7 Transformation von <i>E. coli</i>                            | 32        |
| 3.1.8 Blau / Weiß-Selektion  | 33        |

|  | Seite |
|--|-------|
| <b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b>                                       | 35    |
| 3.2.1 Polymerase Kettenreaktion  | 35    |
| 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese  | 37    |
| 3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung   | 38    |
| 3.2.4 Restriktion  | 38    |
| 3.2.5 Ligation   | 39    |
| 3.2.6 Phosphorylierung   | 39    |
| 3.2.7 DNA-Sequenzanalyse   | 39    |
| <b>3.3 Proteinbiochemische Methoden</b>  | 41    |
| 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                      | 41    |
| 3.3.2 Coomassie-Färbung  | 43    |
| 3.3.3 Lysate von <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. mitis</i>                      | 44    |
| 3.3.4 PBP-Markierung mit Bocillin FL   | 44    |
| 3.3.5 Western Blot   | 45    |
| 3.3.6 Immunologische Analyse von Western Blots                                 | 45    |
| 3.3.7 Überexpression von GST-Fusionsproteinen                                  | 47    |
| 3.3.8 Quantifizierung von Proteinen  | 50    |
| 3.3.9 Gelfiltration  | 50    |
| 3.3.10 Herstellung von Antiseren   | 51    |
| 3.3.11 Affinitätsreinigung von Antikörpern                                     | 51    |
| <br>   |       |
| <b>4. Ergebnisse</b>   | 54    |
| <b>4.1 Deletion von <i>pbp2a</i> und Cefotaxim-Resistenz</b>                   | 54    |
| 4.1.1 Transformation von C303 mit <i>pbp2a</i> C403 mit Cefotaxim-Selektion    | 55    |
| 4.1.2 <i>CiaH</i> -Mutationen und Cefotaximselektion                           | 57    |
| 4.1.3 Transformation von C303 mit <i>pbp2a</i> C403 ohne Cefotaxim-Selektion   | 58    |
| 4.1.4 Deletion von PBP2a in PBP2x-Mutanten                                     | 61    |
| <b>4.2 PBP2a in Penicillin-resistenten klinischen Streptokokkenisolaten</b>    | 64    |
| 4.2.1 PBP2a-Allele in klinischen Streptokokkenisolaten                         | 64    |
| 4.2.2 PBP2a von <i>S. mitis</i> B6 und Resistenz                               | 67    |
| 4.2.3 <i>pbp2a</i> -Allele mit definierten Punktmutationen                     | 71    |
| <b>4.3 Inaktivierung des <i>cia</i>-Systems in <i>pbp2a</i>-Transformanten</b> | 76    |

|  | Seite |
|--|-------|
| <b>4.4 Immunologische Analyse von PBP2x und PBP2a</b>  | 79    |
| 4.4.1 Bestimmung der Anzahl von PBP2x-Molekülen pro Zelle  | 79    |
| 4.4.2 Immunologische Analyse von PBP2a aus Labormutanten und<br>klinischen Isolaten                                | 86    |
| 4.4.3 Gewinnung von PBP2a-Antiseren  | 87    |
| 4.4.4 Western Blot Analyse von C-Mutanten mit PBP2a-Mutation   | 92    |
| 4.4.5 Western-Blot-Analyse von PBP2a aus klinischen<br>Streptokokken-Isolaten                                      | 92    |
| <b>5. Diskussion</b>   | 95    |
| <b>5.1 Deletion von <i>pbp2a</i>: Auswirkungen auf Cefotaxim-Resistenz</b>   | 95    |
| <b>5.2 <i>pbp2a</i>-Allele aus klinischen Streptokokken-Isolaten</b>   | 97    |
| <b>5.3 Die Mutationen T411&gt;A und Q431&gt;L</b>  | 100   |
| <b>5.4 PBP2a und CiaRH</b>   | 101   |
| <b>5.5 Quantifizierung der PBP2x-Moleküle pro Zelle</b>  | 103   |
| <b>5.6 Immunologische Analyse von PBP2a in Labormutanten und<br/>            klinischen Streptokokken-Isolaten</b> | 104   |
| <br>   |       |
| IV. Literaturverzeichnis   | 107   |
| V. Anhang  | 118   |

## II. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem penicillin-bindenden Protein 2a (PBP2a) von *Streptococcus pneumoniae* und dessen Rolle bei der  $\beta$ -Lactam-Resistenz. Hierbei sind grundsätzlich zwei verschiedene Typen von mutiertem PBP2a zu unterscheiden.

In Cefotaxim-resistenten Labormutanten kommt es in höheren Selektionsstufen zum Verlust von PBP2a durch das Auftreten von vorzeitigen Translations-Stops. Eine solche Mutation wird bei Mutante C403 durch die Wiederholung eines Genabschnitts von 8bp Länge verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Art der Mutation einen geringen Einfluss auf die Resistenz hat. Jedoch ist der Verlust des PBP nicht alleine für die Erhöhung des Resistenzniveaus in C403 verantwortlich.

Auch in einem Stamm mit einem Mosaik-PBP2x klinischen Ursprungs führt die Transformation mit dem *pbp2a* von C403 zu einer leichten Erhöhung der Resistenz.

Die Mutation des *pbp2a* von C403 hat auch Auswirkungen auf das Wachstums- und Lyseverhalten von *Streptococcus pneumoniae*. Eine Mutante des Wildtyps R6 mit dem *pbp2a* von C403 zeigt ein langsames Wachstum und eine früher einsetzende Lyse.

In  $\beta$ -Lactam-resistenten klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus mitis* treten niederaffine PBP2a-Varianten auf, welche auch unter Cefotaxim-Selektion transformiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die isolierte Übertragung eines für ein niederaffines PBP2a codierenden Gens zur deutlichen Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz eines Stamms mit Mosaik-PBP2x führt. Im Gegensatz zum *pbp2a* von C403 verursacht das *pbp2a* von *Streptococcus mitis* B6 im Wildtyp eine später einsetzende Lyse. Das Wachstum ist jedoch ebenso verlangsamt wie nach dem Verlust von PBP2a.

Bei der Analyse niederaffiner PBP2a-Varianten aus klinischen Isolaten traten zwei Mutationen häufig auf, die immer gemeinsam anzutreffen sind: Die Mutation T411>A, welche direkt stromabwärts des aktiven Serins der Penicillin-bindenden Domäne lokalisiert ist, und die Mutation Q431>L. Es konnte demonstriert werden, dass die erste Mutation einen starken Abfall der Affinität gegen Bocillin FL verursacht und die zweite Mutation einen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE hat.

Die Inaktivierung des signal-tranzuzierenden Zwei-Komponenten-Systems CiaRH führt in Mutanten mit inaktiviertem PBP2a zu einer Rückkehr der Wachstumsrate auf Wildtyp-Niveau. Stämme mit niederaffinem PBP2a zeigen nach Inaktivierung von CiaRH eine Verkürzung der stationären Phase, ähnlich wie dies bereits für PBP2x beschrieben wurde.



Durch die Experimente im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Mutationen in PBP2a einen Einfluß auf die Cefotaxim-Resistenz, das Wachstum und die Lyse von *Streptococcus pneumoniae* haben können. Auftreten und Ausmaß dieser Effekte sind abhängig von der Art der Mutation und dem genetischen Hintergrund in den diese transformiert wird.

### III. Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| Abb.               | Abbildung                                     |
| AS                 | Aminosäure(n)                                 |
| ATP                | Adenosin-5'-triphosphat Galactopyranosid      |
| BCIP               | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat              |
| bp                 | Basenpaare                                    |
| BSA                | Bovines Serum-Albumin                         |
| bzw.               | beziehungsweise                               |
| C-Mutanten         | Cefotaxim-selektionierte Mutanten             |
| cfu                | Colony-forming unit                           |
| CSP                | Competence stimulating peptide                |
| CTX                | Cefotaxim                                     |
| d.h.               | das heißt                                     |
| DMF                | di-Methyl-Formamid                            |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                        |
| ERG                | Eppendorf Reaktionsgefäß                      |
| f.c.               | finale Konzentration                          |
| GST                | Glutathion S-Transferase                      |
| hmw                | high molecular weight                         |
| IDM                | Insertion-Duplikations-Mutagenese             |
| IPTG               | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid    |
| IS                 | Insertions-Sequenz                            |
| K.O.               | Knock-out                                     |
| kan <sup>r/s</sup> | Kanamycin-resistent/-sensitiv                 |
| kbp                | Kilo-Basenpaare                               |
| lmw                | low molecular weight                          |
| MCS                | Multiple-Cloning-Site                         |
| MHK                | Minimale Hemmkonzentration                    |
| N                  | Nephelo                                       |
| NBC                | Nano-Bio-Center                               |
| NBT                | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid                  |
| NCBI               | National Center for Biotechnology Information |
| ND                 | not determined                                |
| OD <sub>xxx</sub>  | Optische Dichte bei xxx nm Wellenlänge        |
| P-Mutanten         | Piperacillin-selektionierte Mutanten          |
| PAGE               | Polyacrylamid-Gelelektrophorese               |
| PBP                | Penicillin-bindendes Protein                  |
| PCR                | Polymerase Kettenreaktion                     |
| PEN                | Penicillin                                    |
| PL                 | Polen   |
| rfu                | relative fluorescence unit (Image Quant)      |
| ROM                | Rumänien                                      |
| rpm                | Umdrehungen pro Minute                        |
| RT                 | Raumtemperatur                                |
| SDS                | Natrium-Dodecyl-Sulfat                        |

|                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| SIU                | Scion Image Units                |
| str <sup>r/s</sup> | Streptomycin-resistent/-sensitiv |
| Tab.               | Tabelle                          |
| TCS                | Two-component-system             |
| T <sub>d</sub>     | Generationszeit                  |
| TM                 | Transmembran-Domäne              |
| ÜN                 | über Nacht                       |
| V                  | Volt                             |
| z.B.               | zum Beispiel                     |

## **1. Einleitung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Mutationen des Penicillin-bindenden Proteins 2a (PBP2a) auf die  $\beta$ -Lactam-Resistenz von *Streptococcus pneumoniae*, sowie weiteren physiologischen Auswirkungen von Veränderungen in diesem Enzym für das Bakterium.

In Streptokokken werden Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactame primär durch Veränderungen in Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs) verursacht. Solche Veränderungen in PBP2a, die sowohl in klinischen Isolaten als auch Labormutanten von *S. pneumoniae* gefunden wurden, konnten bisher nicht eindeutig mit  $\beta$ -Lactam-Resistenz assoziiert werden. Ob ein Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und einer Antibiotikaresistenz besteht und, wenn ja welcher Art dieser ist, soll durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente beleuchtet werden.

### **1.1 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* ist ein Gram-positives Bakterium aus der Familie der Streptococcaceae, welche zur Ordnung der Lactobacillales zählt. Wie der frühere Name *Diplococcus pneumoniae* verrät, liegen die runden oder leicht ovalen Kokken mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,25  $\mu\text{m}$  meist in Paaren vor, gelegentlich auch in kurzen Ketten. *S. pneumoniae* ist fakultativ anaerob, Katalase-negativ und kann auf bluthaltigen Nährböden kultiviert werden, wo sich durch die sogenannte  $\alpha$ -Haemolyse klare, grünliche Höfe um die Kolonien bilden (Madigan *et al.*, 2001). Pneumokokken bilden eine Polysaccharid-Kapsel, die es ihnen ermöglicht, von Teilen des menschlichen Immunsystems unerkant zu bleiben (Review: Paton und Morona, 2007).

Sowohl in der Geschichte der Medizin als auch in der Geschichte der Molekularbiologie stellen Pneumokokken eine der wichtigsten humanpathogenen Bakterienarten dar. Bis in die 40er Jahre des letzten Jahrhunderts war *S. pneumoniae* als todbringender Erreger gefürchtet, der die Medizin vor größere Probleme stellte als Krebs und cardiovaskuläre Erkrankungen zusammen (White *et al.*, 1979). Die von Pneumokokken verursachten Erkrankungen, wie zum Beispiel Lungenentzündung (Pneumonie), Hirnhautentzündung (Meningitis) oder Mittelohrentzündung (Otitis media) sind heutzutage dank des Einsatzes von Penicillin und weiterer  $\beta$ -Lactame im Allgemeinen gut therapierbar. Jedoch treten seit

den 1970er Jahren  $\beta$ -Lactam-resistente *S. pneumoniae*-Klone auf, die sich inzwischen mehr und mehr ausbreiten. Die Verbreitung dieser Resistenzen erschwert die Behandlung der erkrankten Patienten (Jedrzejewski *et al.*, 2001).

Auch für die Grundlagen der Molekularbiologie stellen mit *S. pneumoniae* erzielte Forschungsergebnisse Meilensteine dar. So konnte Frederick Griffith das „transformierende Prinzip“ anhand der Übertragung der Kapsel-Gene von bekapselten auf unbekapselte Pneumokokken zeigen (Griffith, 1928). Zu dieser Zeit war allerdings noch nicht bekannt, dass es sich hierbei um Gene handelt, und dass diese aus DNA bestehen. Dieser Nachweis glückte Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty durch Behandlung der Erbinformation enthaltenden Zellextrakte mit verschiedenen Enzymen. Einzig die Desoxyribonuklease verhinderte die Übertragung des Kapsel-Phänotyps. Ergo musste das „transformierende Prinzip“ aus der Substanz bestehen die durch dieses Enzym abgebaut wird: DNA (Avery *et al.*, 1944).

Beiden Experimenten liegt die Fähigkeit von *S. pneumoniae* zu Grunde freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen und ins eigene Genom zu integrieren. Diese Fähigkeit bezeichnet man als natürliche Kompetenz. Sie wird durch das signaltransduzierende Zwei-Komponenten-System ComDE reguliert, welches durch CSP (competence stimulating peptide) aktiviert wird. CSP ist das Genprodukt von *comC*, welches beim Export aus der Zelle durch einen ATP-abhängigen Transporter ComAB prozessiert wird. Da ComE die Expression sowohl von *comCDE* als auch von *comAB* positiv reguliert, reagiert dieses System abhängig von der Zelldichte im Medium. Neben den frühen Kompetenzgenen *comABCDE* induziert ComE den alternativen Sigma-Faktor ComX. Dieser steuert die Expression sogenannter später Kompetenzgene, darunter die, welche für Aufnahme und Integration der freien DNA im Medium verantwortlich sind (Review: Johnsborg und Havarstein, 2009).

## 1.2 $\beta$ -Lactam-Resistenz

Wie bereits zuvor erwähnt wird die Therapie der Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen durch das vermehrte Auftreten  $\beta$ -Lactam-resistenter Klone erschwert. Diese Entwicklung begann in den 70er Jahren des 20sten Jahrhunderts, als erste Stämme mit verminderter  $\beta$ -Lactam-Suszeptibilität auf Papua und in Südafrika isoliert wurden (Klugman und Koornhof, 1988). Doch auch Resistenzen gegen andere Antibiotika

verbreiteten sich über den Globus. So wurden beispielsweise bereits 1977 in Südafrika mehrere klinische *S. pneumoniae*-Isolate des Serotyps 6A entdeckt, die neben einer verminderten  $\beta$ -Lactam-Suszeptibilität Resistenzen gegen Chloramphenicol, Tetrazyklin, Clindamycin, Erythromycin, Rifampizin, Streptomycin und Cotrimoxazol zeigten (Klugman und Koornhof, 1988).

In Europa sind unter den Ländern mit einem hohen Anteil an resistenten Isolaten in erster Linie Spanien und Ungarn zu nennen. Beide Länder hatten bereits 1990 eine Rate Penicillin-resistenter Pneumokokken von über 40% (Linares *et al.*, 1992; Marton *et al.*, 1991).

$\beta$ -Lactame sind bakteriolytische Antibiotika, die auf die Zellwandbiosynthese wirken. Sie blockieren membrangebundene Enzyme, die späte Schritte der Murein-Quervernetzung katalysieren. Da sie Penicillin und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in ihrem aktiven Zentrum kovalent binden, wodurch sie der Fähigkeit zur Quervernetzung der Zellwand beraubt werden, bezeichnet man diese Enzyme als Penicillin-bindende Proteine, kurz PBPs.

$\beta$ -Lactam-Resistenz entsteht in Pneumokokken dadurch, dass durch Mutationen oder horizontalen Gentransfer Gene, die für niederaffine PBPs kodieren, entstehen. Diese produzieren Enzyme mit einer geringeren Affinität gegen  $\beta$ -Lactamen und sorgen so dafür, dass höhere Konzentrationen des Antibiotikums zur Inhibierung der Zellwandsynthese gebraucht werden.

Neben dieser Art der  $\beta$ -Lactam-Resistenz bei Pneumokokken wurde in resistenten Labormutanten Mutationen in Genen gefunden, die nicht für PBPs codieren. So haben Mutationen im signaltransduzierende Zwei-Komponenten-System CiaRH einen Einfluß auf die Cefotaxim-Suszeptibilität (Guenzi *et al.*, 1994; siehe 1.6). Mutationen in der Glycosyltransferase CpoA führen zu einer Erhöhung der Piperacillin-Resistenz (Grebe *et al.*, 1997). Mutationen in diesen nicht PBP-Genen sind in klinischen Isolaten bisher nicht beschrieben. Dort können Veränderungen in MurMN, die die Synthese der Interpeptidbrücke des Mureins katalysieren, zu hoher Resistenz beitragen (Filipe und Tomasz, 2000).

### 1.3 Penicillin-bindende Proteine

Die späten Schritte der Quervernetzung des Mureins in der bakteriellen Zellwand werden von Membran-gebundenen Enzymen katalysiert, die entweder eine Transpeptidase-Aktivität oder eine D,D-Carboxypeptidase-Aktivität oder beide zugleich besitzen. Diese Klasse von Enzymen geht mit  $\beta$ -Lactamen eine stabile Verbindung ein, indem sie das Antibiotikum kovalent an einen Serin-Rest in ihrem aktiven Zentrum bindet. Der prominenteste Vertreter der  $\beta$ -Lactame fand somit Einzug in den Namen dieser Gruppe von Enzymen, den PBPs. Diese sind mit den Serin- $\beta$ -Lactamasen verwandt (Review: Ghuysen, 1991) Die beiden Proteingruppen, die unter dem Begriff Penicilloyl-Serin-Transferasen zusammengefasst werden, unterscheiden sich durch unterschiedliche Reaktions-Konstanten (Abb. 1.1). Während bei  $\beta$ -Lactamasen der Enzym-Penicilloyl-Komplex kurzlebig ist und das Antibiotikum schnell zu einem inaktiven Penicillin-Derivat hydrolysiert wird, ist dieser bei der Reaktion von PBPs wesentlich stabiler und das Enzym somit über einen langen Zeitraum inaktiviert. Dies führt bei entsprechenden  $\beta$ -Lactam-Konzentrationen zu einer Hemmung der Zellwand-Synthese.

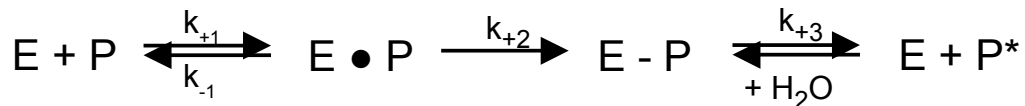


Abb. 1.1: Reaktion von Penicilloyl-Serin-Transferasen (E) und  $\beta$ -Lactamen (P); k = Reaktionskonstante, P\*= hydrolysiertes  $\beta$ -Lactam;

Penicillin-bindende Protein werden nach ihrer Sequenz-Homologie und Funktion in hochmolekulare (hmw-) PBPs der Klassen A und B sowie niedermolekulare (lmw-) PBPs unterschieden. Des weiteren zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie als Multidomänen-Proteine neben der namensgebenden Penicillin-Bindungsdomäne mit den für Penicilloyl-Serin-Transferasen charakteristischen Peptidmotiven SxxK, SxN und K(T/S)G auch N- und C-terminale Domänen enthalten. So zeigt der N-terminale Bereich der Klasse A hmw-PBPs eine Moenomycin-sensitive Transglycosylase-Aktivität (Paik *et al.*, 1999; Di Guilmi *et al.*, 1998). Die lmw-PBPs weisen keine N-terminale Domäne auf.

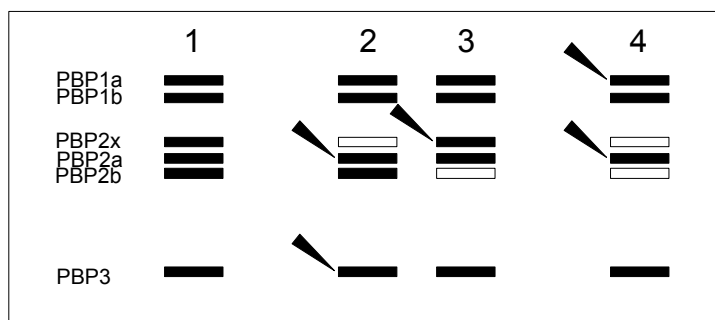
Bei der Resistenzentwicklung in *S. pneumoniae* spielen die PBPs 2x und 2b eine zentrale Rolle. Veränderungen in diesen beiden Enzymen führen zu niedrigen Resistenzniveaus.

Daher werden sie auch als primäre Resistenzdeterminanten bezeichnet (Grebe und Hakenbeck, 1996). Mutationen in diesen essentiellen PBPs sind auch Voraussetzung für hohe Resistenz, die durch mehrere Mutationen in anderen PBPs verursacht wird (Review: Hakenbeck *et al.*, 1999). Hierbei ist in klinischen Isolaten in der Regel ein mutiertes PBP1a der entscheidende Faktor. So zeigt sich beispielsweise bei der Resistenz gegen Cefotaxim, dass zusätzlich zu einem niederaffinen PBP2x ein verändertes PBP1a für hohe Resistenzniveaus (MIC über 1 µg/ml) benötigt wird (Munoz *et al.*, 1992).

Bei allen drei im letzten Abschnitt erwähnten PBPs tritt in resistenten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* eine Besonderheit auf: Die veränderten Sequenzbereiche sind in so genannten Mosaikblöcken angeordnet. Diese sind Abschnitte in der DNA Sequenz, die einen hohen Grad von bis zu über 20 % an unterschiedlichen Basenpaaren aufweisen im Vergleich zu den Genen sensibler Stämme. Diese Mosaikgene sind im allgemeinen innerhalb eines Klons stabil.

Man geht inzwischen davon aus, dass die Mosaikgene das Resultat von horizontalem Gentransfer sind. Eine Quelle für diese homologe DNA stellen die entsprechenden Gene in verwandten Streptokokken-Arten dar. Hierbei sind vor allem kommensale Spezies zu nennen, deren Gene sehr ähnlich den PBP-Mosaikblöcken in resistenten Pneumokokken sind (Sibold *et al.*, 1994; Dowson *et al.*, 1993).

Im Gegensatz zu den Mosaikblöcken in klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten findet man in Labormutanten hauptsächlich einzelne Punktmutationen, die die Suszeptibilität gegen  $\beta$ -Lactame beeinflussen.

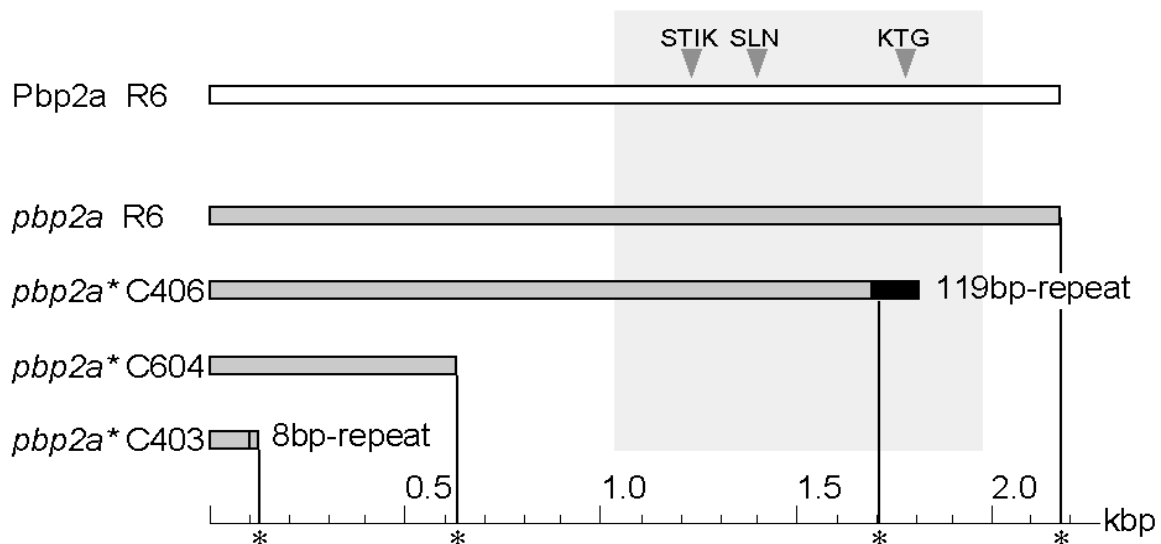


**Abb. 1.2:** PBPs in  $\beta$ -Lactam-resistenten *S. pneumoniae*: Niederaffine PBPs in Labormutanten, die mit Cefotaxim (2) und Piperacillin (3) selektiert wurden, sowie in klinischen Isolaten. Die primären Resistenz-determinanten PBP2x und PBP2b sind als weiße Balken dargestellt. PBPs, die zum Erreichen höherer Resistenz modifiziert werden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Wildtyp *S. pneumoniae* R6 (1) ist links dargestellt.



## 1.4 Cefotaxim-resistente Labormutanten

Zur Erforschung der Veränderungen in PBPs bei der Entwicklung von Resistenzen wurden Mitte der 80er Jahre spontan-resistente Labormutanten auf steigenden Konzentrationen von Piperacillin beziehungsweise Cefotaxim selektioniert (Laible und Hakenbeck, 1987). Bei den Piperacillin-resistenten Mutanten (P-Mutanten) zeigten sich zunächst Punktmutationen in PBP2b gefolgt von solchen in PBP2x (Hakenbeck *et al.*, 1994). In beiden Fällen führten diese Mutationen zu Aminosäureaustauschen, die die Affinität des Enzyms gegenüber  $\beta$ -Lactamen beeinflussen. Gleiches gilt auch für das erste von Veränderungen betroffene PBP bei den Cefotaxim-selektionierten Mutantenfamilien (C-Mutanten), nämlich erneut PBP2x. Da PBP2b mit diesem Cephalosporin nicht interagiert (Hakenbeck *et al.*, 1987), wurden auch keine Mutationen in diesem Enzym selektioniert. In drei von sechs unabhängig generierten C-Mutantenfamilien traten ab Selektionsstufe 4 auch Mutationen in PBP2a auf. In den Mutanten C403, C604 und C406 kann PBP2a in Bindungsstudien nicht mehr markiert werden. Die dem zu Grunde liegenden Mutationen unterscheiden sich jedoch deutlich von den in PBP2x und PBP2b. In allen drei Fällen wird die Expression eines funktionellen PBP2a durch ein vorzeitiges Stop-Codon in *pbp2a* verhindert (van der Linden, unveröffentlichte Ergebnisse; Abb. 1.2). Die Ursache hierfür ist in C604 in einem Austausch von  $G_{644}>A$  welcher aus einem TGG (Tryptophan) ein TAG, also ein Stop-Codon macht, zu suchen. Bei C403 und C406 wurde eine 8bp- (C403) beziehungsweise 119bp (C406) langer Genabschnitt dupliziert. In Folge der daraus resultierenden Leseraster-Verschiebung kommt es zum vorzeitigen Translations-Stop. Diese Art der Mutation wurde bisher nicht beschrieben.



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Lokalisation von *pbp2a*-Mutationen in den Cefotaxim-resistenten Labormutanten C406, C604 und C403. Duplizierte Sequenzabschnitte (repeats) sind als schwarze Abschnitte dargestellt. Der für die Transpeptidase-Domäne codierende Bereich ist hellgrau hinterlegt. Zur Orientierung sind Gen- bzw. Protein-repräsentierenden Balken des Wildtyps R6 angegeben; die Dreiecke bezeichnen die Position der Homologieboxen innerhalb der Transpeptidasedomäne.

Bei der Mutante C403, die den frühesten Translations-Stop in *pbp2a* aufweist ist die Steigerung der Cefotaxim-Resistenz verglichen mit der Ausgangs-Mutante am deutlichsten: Bei C303 ist ab 0,35 µg/ml Cefotaxim kein Wachstum zu verzeichnen, während die MHK von C403 1,1 µg/ml beträgt (van der Linden, unveröffentlichte Daten).

## 1.5 PBP2a

Neben den Mutationen in C-Mutanten sind auch niederaffine PBP2a-Varianten aus klinischen Streptokokken-Isolaten bekannt. Da ein niederaffines PBP2a bei einer Transformation mit chromosomaler DNA und anschließender Cefotaxim-Selektion von einem klinischen *S. pneumoniae*-Isolat auf den Wildtyp R6 übertragen wurde (Reichmann *et al.*, 1996 & 1997) vermutete man, dass auch PBP2a bei der Entwicklung von Resistenz gegen  $\beta$ -Lactame eine Rolle spielt. Diese Übertragung ist ebenso möglich, wenn die Donor DNA von einem resistenten *S. mitis* Isolat stammt (Hakenbeck *et al.*, 1998). Weiterhin wurden bereits Anzeichen dafür gefunden, dass PBP2a nicht nur bei der Cefotaxim-, sondern auch bei der Penicillin-Resistenz in klinischen Isolaten eine Rolle spielt (Smith *et al.*, 2005). PBP2a besitzt eine 12-fach höhere Affinität zu Cefotaxim als zu

Penicillin (Zhao *et al.*, 1999); eventuell spielt Cefotaxim als Selektionsantibiotikum auch eine Rolle bei klinischen Isolaten, da es seit einiger Zeit vermehrt therapeutisch verwendet wird.

Eine zentrale Rolle beim Einfluss von PBP2a auf die Cefotaxim-Resistenz könnte der Austausch des Threonin neben dem aktiven Serin gegen ein Alanin spielen (Sanbongi *et al.*, 2004). Eine analoge Mutation wurde bereits in PBP2x beschrieben (T<sub>338</sub>>A) und ist dort ebenfalls mit  $\beta$ -Lactam-Resistenz assoziiert (Mouz *et al.*, 1999; Zerfass *et al.*, 2009). Im Falle von *pbp2a*-Varianten in klinischen resistenten *S. pneumoniae* ist die DNA Sequenz deutlich weniger verändert als bei *pbp2x*, *pbp2b* oder *pbp1a*. Aussagen über Mosaik-Blöcke sind daher problematisch (Chesnel *et al.*, 2005; DuPlessis *et al.*, 2000).

Über die *in vivo*-Funktion von PBP2a ist wenig bekannt. PBP2a ist bei der Zellteilung nicht am Septum lokalisiert, sondern folgt dem äquatorialen Ring. Dort spielt PBP2a zusammen mit PBP2b möglicherweise eine Rolle bei der peripheren Murein-Synthese (Morlot *et al.*, 2003). Neben der Transpeptidase-Domäne besitzt PBP2a, ein Vertreter der Klasse A-hmw-PBPs, auch die Glycosyltransferase-Domäne. Mutanten, bei denen *pbp2a* entfernt wurde, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Moenomycin, einem Antibiotikum, das nur die Glycosyl-Transferase-Aktivität hemmt. Mutanten mit inaktivierten PBP1a oder PBP2a können dargestellt werden, da sich offenbar die Transglycosylase-Aktivitäten beider PBPs komplementieren können. Eine Doppelmutation ist jedoch lethal (Paik *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 1999).

## 1.6 Das signaltransduzierende Zwei-Komponenten-System CiaRH

Bei der Analyse der bereits erwähnten Labormutanten (Laible und Hakenbeck, 1987) wurden neben den Mutationen in PBPs auch Mutationen in anderen Genen gefunden. Bei den C-Mutanten treten in allen selektionierten Familien Mutationen in *ciaH* auf, welches für die Histidinkinase CiaH (Zähler *et al.*, 2002) kodiert. Diese bildet gemeinsam mit dem Response-Regulator CiaR das signaltransduzierende Zwei-Komponenten-System (Two-component system, TCS) CiaRH (Guenzi *et al.*, 1994). Das Signal für die Sensorkinase CiaH ist nicht bekannt. Zum Cia-Regulon gehören mindestens 10 Gene und fünf nicht-kodierende RNAs (Mascher *et al.*, 2007; Halfmann *et al.*, 2007). Des Weiteren besteht eine

Verbindung zum ComDE-regulierten Kompetenzregulon (Dagkessamanskaia et al., 2004). Die Inaktivierung des CiaRH-TCS führt beim Wildtyp *S. pneumoniae* R6 nur zu einem schwachen Phänotyp bezüglich der  $\beta$ -Lactam-Resistenz (Guenzi et al., 1994). Die Mutante wächst etwas langsamer, erreicht nicht ganz die Kulturtrübung des Parentalstamms und lysiert etwas früher. Dieser Effekt verstärkt sich jedoch deutlich wenn ein inaktiviertes CiaRH-System mit PBP2x-Mutationen kombiniert wird (Mascher et al., 2007). In diesem Fall verdoppelt sich die Generationszeit verglichen mit dem Wildtyp und es kommt zu einer deutlich schnelleren Autolyse. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob es einen ähnlichen Zusammenhang auch bezogen auf PBP2a gibt.

Betrachtet man die Abfolge der Mutationen in den C-Mutanten, so fällt auf, dass alle drei PBP2a-Deletionen in Mutanten-Linien vorkommen, die bereits CiaH-Veränderungen aufweisen (van der Linden, unveröffentlichte Ergebnisse; Tab. 1.1) Alle CiaH-Mutationen, die in den Linien C003 und C006 auftreten, wurden bereits als CiaRH-aktivierend („ON“-Mutation) beschrieben (Mascher et al., 2007; Müller, unveröffentlichte Daten) und führen zu einem Transformations-defizienten Phänotyp.

**Tab. 1.1:** Ausgewählte Familien spontanresistenter Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 (Laible et al., 1987) und deren mutierte Gene : 1. Spalte: Selektionsstufe, 1. Zeile: Mutantenfamilie.

|   | C003         | C004         | C006         |
|---|--------------|--------------|--------------|
| 0 | R6           |              |              |
| 1 | <i>ciaH</i>  | <i>ciaH</i>  | <i>pbp2x</i> |
| 2 | <i>pbp2x</i> | <i>pbp2x</i> | <i>pbp2x</i> |
| 3 | <i>pbp2x</i> | unbekannt    | <i>ciaH</i>  |
| 4 | <i>pbp2a</i> | <i>pbp2x</i> | <i>pbp2a</i> |
| 5 | <i>pbp2x</i> | <i>pbp2x</i> | <i>pbp2x</i> |
| 6 |              | <i>pbp2a</i> | <i>pbp2x</i> |

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß von Mutationen in PBP2a auf die  $\beta$ -Lactam-Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* untersucht werden. Hierzu sollte zunächst analysiert werden, inwieweit die *pbp2a*-Mutation in der Labormutante C403 für das hohe MHK-Niveau der Mutante verantwortlich ist. Des Weiteren sollte der Effekt dieser Mutation in anderen genetischen Hintergründen untersucht werden, wobei sowohl verschiedene PBP2x Mutanten als auch Stämme, die ein Mosaik-PBP2x enthalten, eingeschlossen werden sollten.

Neben dem Ausschalten des Proteins, wie bei den C-Labormutanten, sollte der mögliche Einfluss niederaffiner PBP2a-Varianten auf die  $\beta$ -Lactam-Resistenz geklärt werden. Der Vergleich dieser beiden Situationen sollte dazu beitragen die genetischen Voraussetzungen für eine PBP2a-vermittelte Resistenz in Labor- und Klinik-Stämmen besser verstehen zu können.

Ein Vergleich der Sequenz publizierter und neu sequenzierter *pbp2a*-Allele klinischer Isolate sollte die Identifikation von Schlüsselpositionen ermöglichen, um resistenz-spezifische Mutationen zu identifizieren.

Weiterhin sollt geklärt werden, ob für Mutationen in PBP2a das CiaRH-System wichtig ist, ähnlich wie bei PBP2x.

Eine Analyse von PBP-Mengen auf Protein-Ebene soll durch die Verwendung polyklonaler PBP-spezifischer Antikörper durchgeführt werden. Ein PBP2x-spezifisches Antiserum stand hierzu zur Verfügung. Darüber hinaus sollten PBP2a-spezifische Antikörper generiert werden.

## 2. Material

### 2.1 Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Kategorien von Bakterienstämmen verwendet:

- Derivate von *Streptococcus pneumoniae* R6
- klinische Isolate von *S. pneumoniae*, *S. mitis* und *S. oralis*
- Laborstämme von *Escherichia coli* für Klonierungen und zur Proteinüberexpression

Alle Stämme und ihre relevanten Eigenschaften sind in den Tabellen 2.1 – 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.1: Derivate von *S. pneumoniae* R6

| Stamm  | Mutationen  | Literatur, Herkunft   |
|--|---|---|
| <i>S. pneumoniae</i> R6                        | unbekapseltes Derivat des Stammes R36A (Rockefeller University, New York, USA)  | Avery <i>et al.</i> , 1944<br>Ottolenghi und Hothkiss, 1962 |
| <i>S. pneumoniae</i> C303                      | CiaH A <sub>203</sub> >V<br>PBP2x G <sub>597</sub> >D<br>PBP2x T <sub>550</sub> >A  | Laible und Hakenbeck, 1987                                  |
| <i>S. pneumoniae</i> C403                      | Siehe <i>S.p.</i> C303<br>Duplikation eines Sequenzabschnitts in <i>pbp2a</i> (C <sub>84</sub> -C <sub>91</sub> )           | Laible und Hakenbeck, 1987                                  |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x 2349</sub>  | <i>pbp2x</i> A <sub>456</sub> >T – C <sub>2234</sub> >A Mosaikblock aus <i>S.p.</i> 2349                                    | Bergmann, 2003<br>Reichmann <i>et al.</i> , 1997            |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>AmiA9</sub>       | <i>str41</i> A <sub>167</sub> >C  | Salles <i>et al.</i> , 1992                                 |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x U11</sub>   | <i>pbp2x</i> Mosaikblock aus <i>S. p.</i> U11   | Reichmann <i>et al.</i> , 1996                              |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x T550A</sub> | <i>pbp2x</i> T <sub>550</sub> >A<br>(Bei der Transformation von <i>pbp2x</i> aus C303 wurde nur diese Mutation übertragen.) | Mascher <i>et al.</i> , 2006                                |

Tab. 2.2: Klinische *S. pneumoniae*-Isolate aus Rumänien (ROM) und Polen (PL)\*

| Stamm | Isolation aus                           | Serotyp | MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]** |      |
|-------|---|---------|----------------------------|------|
|       |   |         | 1                          | 2    |
| 34    | Pleuralflüssigkeit, ROM 2004            | ND      | 4                          | 0,5  |
| 76    | Mittelohrflüssigkeit, ROM 2004          | ND      | 8                          | 8    |
| 116   | Bindehaut, ROM 2003                     | ND      | 4                          | 2    |
| 40    | Blut, PL 2002                           | 23F     | 8                          | 4    |
| 657   | Sputum, PL 2001                         | 6B      | 0,12                       | 0,06 |
| 909   | bronchoalveoläre Lavage, PL 2000        | 23F     | 4                          | 2    |
| 2904  | Blut, PL 1998                           | 23F     | 4                          | 4    |
| 2907  | Nebenhöhlenflüssigkeit, PL 2001         | 6B      | 0,5                        | 0,25 |
| 4134  | Sputum, PL 1998                         | 6B      | 2                          | 0,5  |
| k421  | Innenohr, PL 1995                       | 6B      | 2                          | 2    |
| k585  | bronchoalveolären Lavage, PL 1997       | 23F     | 4                          | 1    |
| k598  | bronchoalveolären Lavage, PL 1997       | 23F     | 8                          | 16   |
| k637  | Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, PL 1997 | 23F     | 8                          | 1    |

\* Die hier aufgeführten *S.p.*-Isolate aus Polen wurden von Izdebski *et al.* (2007) beschrieben

\*\* 1= Benzylpenicillin; 2=Cefotaxim

Tab. 2.3: Klinische Isolate von *S. pneumoniae*, *S. mitis* und *S. oralis*

| Stamm                     | MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ] | Literatur                      |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <i>S. pneumoniae</i> 2349 | PEN 2; CTX 2             | Reichmann <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>S. mitis</i> B6        | PEN 64; CTX 128          | König <i>et al.</i> , 1998     |
| <i>S. oralis</i> Uo5      | PEN >12; CTX 12          | Reichmann <i>et al.</i> , 1997 |

Tab. 2.4: Laborstämme von *Escherichia coli*

| Stamm                       | Genotyp   | Herkunft                   |
|-----------------------------|---|----------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | K12: <i>phi80 dlacZ deltaM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk-,mk+) supE44 relA1 deoR delta(lacZYA-argF)U169</i> | Invitrogen, Karlsruhe      |
| <i>E. coli</i> BL21         | B: F- <i>dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i>                                 | Stratagene, La Jolla (USA) |

## 2.2 Nährmedien

Zur Kultivierung von *S. pneumoniae* sind Medien notwendig, die die komplexen Nährstoffanforderungen des Bakteriums erfüllen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, sofern nicht explizit gegenteilig beschrieben, für Flüssigkulturen das semisynthetische Komplexmedium CpH8 verwendet. Es leitet sich von den von Adams (Adams und Roe, 1945) und Lacks (Lacks und Hotchkiss, 1960) beschriebenen Medien ab. Die einzelnen Komponenten des Mediums wurden vor Beginn des jeweiligen Experiments im in Tab. 2.5 aufgeführten Mengenverhältnis steril gemischt.

Tab 2.5: Komponentenmischverhältnis von CpH8

| Komponente                      | Volumen |
|---------------------------------|---------|
| preC                            | 400 ml  |
| Supplement                      | 13 ml   |
| Glutamin 1 mg/ml (autoklaviert) | 10 ml   |
| Adams III                       | 10 ml   |
| Pyruvat 2% (autoklaviert)       | 5 ml    |
| Phosphatpuffer pH8              | 15 ml   |
| Hefeextrakt 5% (autoklaviert)   | 9 ml    |

Tab. 2.6: Unter-Komponenten von CpH8

| 3 in 1 Salts                                |             |
|---|-------------|
| MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O      | 100 g       |
| CaCl <sub>2</sub>                           | 0,5 g       |
| MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O 0,1M | 0,2 ml      |
| H <sub>2</sub> O                            | ad 1.000 ml |
| > autoklaviert                              |             |

| Adams I                            |             |
|------------------------------------|-------------|
| Biotin                             | 0,15 mg     |
| Nicotinsäure                       | 150 mg      |
| Pyridoxin-HCl                      | 175 mg      |
| Ca-Pantothenat                     | 600 mg      |
| Thiamin-HCl                        | 160 mg      |
| Riboflavin                         | 70 mg       |
| H <sub>2</sub> O                   | ad 1.000 ml |
| > sterilfiltriert, dunkel gelagert |             |



| Adams II                               |             |
|--|-------------|
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0,5 g       |
| CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O | 0,5 g       |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0,5 g       |
| MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O | 0,2 g       |
| HCl (konz.)                            | 10 ml       |
| H <sub>2</sub> O                       | ad 1.000 ml |
| > sterilfiltriert                      |             |

Tab 2.7: Komponenten von CpH8

| preC                 |             |
|----------------------|-------------|
| Natrium-Acetat       | 1,2 g       |
| Casaminosäuren       | 5 g         |
| L-Tryptophan         | 5 mg        |
| L-Cystein            | 50 mg       |
| H <sub>2</sub> O     | ca. 800 ml  |
| > pH 7,5 eingestellt |             |
| H <sub>2</sub> O     | ad 1.000 ml |
| > autoklaviert       |             |

| Supplement  |        |
|---|--------|
| 3 in 1 Salts  | 60 ml  |
| Glucose 20%   | 120 ml |
| Saccharose 50%  | 6 ml   |
| Adenosin 2 mg/ml                                      | 120 ml |
| Uridin 2 mg/ml  | 120 ml |
| > autoklavierte Komponenten steril zusammenpipettiert |        |

| Adams III                          |             |
|------------------------------------|-------------|
| Adams I                            | 160 ml      |
| Adams II                           | 40 ml       |
| Asparagin                          | 2 g         |
| Cholinchlorid                      | 0,2 g       |
| Calciumchlorid 0,1 M               | 1,6 ml      |
| H <sub>2</sub> O                   | ad 1.000 ml |
| > sterilfiltriert, dunkel gelagert |             |

| 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 |
| > autoklaviert                      |        |

Zur Gewinnung von Zellen zur Präparation chromosomaler DNA oder für die Kultur-PCR wurden *S. pneumoniae* zum Teil auch in PPB-Medium (Reichmann, 1996) angezogen. Dieses Medium zeichnet sich durch seine vergleichsweise einfache Herstellung aus.

Tab 2.8: PPB-Medium

| Komponente   | Menge     |
|--|-----------|
| Trypton  | 20 g      |
| Hefeextrakt  | 10 g      |
| NaCl   | 5 g       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 2,5 g     |
| H <sub>2</sub> O   | ad 990 ml |
| > autoklaviert   |           |
| > nach dem Abkühlen 2 g Glucose (10 ml sterile 20 %ige Glucose-Lösung) zugesetzt |           |

Als Festmedium für *S. pneumoniae* diente D-Blut-Agar. Zu dessen Herstellung wurden die in Tab. 2.9 aufgeführten Bestandteile gemischt und anschließend autoklaviert. Der auf 52°C abgekühlte D-Agar wurde mit Schafsblut (30 ml/l) gemischt und dann in Aliquots zu je ca. 20 ml in sterile Petrischalen gegossen.

Tab 2.9: D-Agar

| Komponente       | Menge       |
|------------------|-------------|
| Glucose          | 1 g         |
| Bactopepton      | 10 g        |
| Neopepton        | 5 g         |
| Hefeextrakt      | 1,25 g      |
| NaCl             | 5 g         |
| Tris             | 1,25 g      |
| Agar             | 15 g        |
| H <sub>2</sub> O | ad 1.000 ml |
| > autoklaviert   |             |

Zur Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen diente Luria-Bertani-Medium (Bertani, 1951), kurz LB (siehe Tab. 2.10). Zur Verwendung als Festmedium wurde das fertige LB vor dem Autoklavieren mit Agar (15 g/l) gemischt.

Tab. 2.10: LB-Medium

| LB Medium            |             |
|----------------------|-------------|
| Hefeextrakt          | 5 g         |
| NaCl                 | 5 g         |
| Pepton (aus Fleisch) | 10 g        |
| H <sub>2</sub> O     | ca. 800 ml  |
| > pH 7 eingestellt   |             |
| H <sub>2</sub> O     | ad 1.000 ml |
| > autoklaviert       |             |

Zur Selektion von Transformanten und teilweise zu deren Charakterisierung wurden den jeweiligen Kulturmedien Antibiotika zugesetzt. Bei Flüssigkulturen erfolgte die Zugabe ins kalte Medium. Bei Festmedien wurde das Antibiotikum mit dem 52°C warmen Agar gemischt und sofort in Petrischalen gegossen.

Tab. 2.11: Verwendete Antibiotika

| Antibiotikum    | Klasse           | Stammlsg. | gelöst in:       | Lagerungs-<br>temperatur |
|-----------------|------------------|-----------|------------------|--------------------------|
| Cefotaxim       | $\beta$ -Lactame | 10 mg/ml  | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Oxacillin       | $\beta$ -Lactame | 10 mg/ml  | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Ampicillin      | $\beta$ -Lactame | 100 mg/ml | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Kanamycin       | Aminoglycoside   | 50 mg/ml  | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Streptomycin    | Aminoglycoside   | 100 mg/ml | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Spectinomycin   | Aminoglycoside   | 80 mg/ml  | H <sub>2</sub> O | -20°C                    |
| Erythromycin    | Makrolide        | 50 mg/ml  | EtOH p.a.        | 4°C                      |
| Tetracyclin     | Teracycline      | 10 mg/ml  | 70 % EtOH        | -20°C                    |
| Chloramphenicol | Nitroaromaten    | 34 mg/ml  | EtOH p.a.        | -20°C                    |

## 2.3 Vektoren

### 2.3.1 pGEM T-easy

pGEM T-easy (Promega) ist ein linearisierter, 3015 bp langer Vektor für TA-Klonierungen. Das bedeutet, dass die 3'-Enden ein überhängendes Thymidin aufweisen, so dass PCR-Produkte, die mit Red GoldStar™-Polymerase amplifiziert wurden, und daher ein 3'-Adenosin besitzen, in den Vektor ligiert werden können. Auf dem Vektor ist die  $\beta$ -Lactamase aus dem Transposon Tn3 kodiert, wodurch er Resistenz gegen Ampicillin vermittelt (Selektion in *E. coli* bei 100  $\mu$ g/ml). Durch das ebenfalls kodierte *lacZ $\alpha$* -Gen wird in *lacZ $\beta$* <sup>+</sup>-Stämmen die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Diese Selektionsmethode wird in Abschnitt 3.1.8. erläutert.

### 2.3.2 pBluescript KS+

pBluescript KS+ (Stratagene) ist ein 2958 bp langer Klonierungsvektor, der wie pGEM T-easy sowohl Ampicillinresistenz vermittelt als auch Blau-Weiß-Selektion ermöglicht.

### 2.3.3 pGEX-6P-1-tet

Das Plasmid ist ein Derivat des pGEX-6P-1-Vektors (GE Healthcare) in dem die Ampicillinresistenz- gegen die Tetrazyklinresistenzkassette aus pBR322 ausgetauscht wurde (Cacciatore *et al.*, 2004). Der Vektor pGEX-6P-1-tet dient zur Überexpression von Proteinen, deren kodierende Gene in seine Multiple-cloning-site (MCS) kloniert wurden. Diese werden als Fusionsproteine mit der Glutathione S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert, was eine anschließende Aufreinigung mittels Glutathion-Affinitäts-Chromatographie ermöglicht. Auch mit diesem Plasmid ist aufgrund des *lacZα*-Gens Blau-Weiß-Screening möglich.

### 2.3.4 pGEX-6P-1-tet 2x-sol.

Bei diesem Derivat von pGEX-6P-1-tet handelt es sich um ein Konstrukt zur Überexpression einer löslichen Form von PBP2x aus *S. pneumoniae* R6. Hierzu wurde der Bereich zwischen den Basen G<sub>5</sub> und T<sub>144</sub> deletiert, der für die Transmembrandomäne (A<sub>19</sub> – I<sub>48</sub>) des Proteins kodiert.

pGEX-6P-1-tet sowie pGEX-6P-1-tet 2x-sol. wurden von Dr. Shwan Rachid konstruiert und für die durchgeführten Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.3.5 pIM2a

Bei pIM2a (Rutschmann, 2003) handelt es sich um ein Derivat des Plasmids pJDC9 (Chen und Morrison, 1988), das konstruiert wurde um *pbp2a* in *S. pneumoniae* durch Insertions-Duplikations-Mutagenese zu inaktivieren.

pJDC 9 ist ein 6,95 kb großer Vektor, der die Erythromycinresistenz-Kassette *ermB* aus pAMβ1 (Brehm, 1987) enthält. Die Erythromycin-Selektion erfolgt in *E. coli* bei 500 µg/ml, in *S. pneumoniae* bei 1 µg/ml.

Da der Vektor in *E. coli* replizieren kann wurden Konstruktions- und Vermehrungsschritte in diesem Bakterium durchgeführt. In *S. pneumoniae* findet eine Replikation des Plasmids nur über Integration in das Genom statt. Diese erfolgt nur mittels homologer Rekombination eines klonierten Genomabschnittes. Erfolgt die Integration in einem kodierenden Bereich, so wird dieser unterbrochen.

Der klonierte homologe Bereich ist im Falle von pIM2a ein 616 bp großes internes *pbp2a*-Fragment (G<sub>985</sub>-A<sub>1600</sub>).

## 2.4 Oligonukleotidprimer

Oligonukleotidprimer für PCR und Sequenzreaktionen wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg), Operon Biotechnologies (Köln) und TIB Molbiol. Syntheselabor (Berlin) bezogen. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in entsprechenden Mengen TE-Puffer gelöst, um Stammlösungen von 100 pmol/μl zu erhalten. Daraus wurden Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 5 pmol/μl in Reinstwasser (siehe 2.5) hergestellt. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 2.12: Verwendete Oligonukleotidprimer

| Gen/ Seq.              | Primer       | H   | Position (A,TG) | Sequenz (5'– 3')*                            |
|------------------------|--------------|---|-----------------|--|
| <i>bbp2a</i>           | 2aDOWN       | 1   | (-1083)-(-1059) | TACACTGCACAACCTGTTCTGACTC                    |
|                        | 2a1U_B6      | 1   | (-253)-(-228)   | CCAGGATTTA CcgTcTCGTT CCAGtG                 |
|                        | 2a1U         | 1   | (-169)-(-144)   | CTAGGGATGAGGAGTTGTTCTCAAG                    |
|                        | 2aATGf_BamH1 | 3   | 1-22            | cgggatcCATGAAATTAGATAAATTATTGA               |
|                        | 2a2U         | 1   | 113-136         | ATTAGCCCAAGTAGGTCCGATTCCG                    |
|                        | 2aTMf        | 3   | 234-255         | TCGACCAATGTCAATGATTTCG                       |
|                        | 2aTMf_BamH1  | 3   | 234-255         | cgggatcctccTCGACCAATGTCAATGATTTCG            |
|                        | 2a3U         | 1   | 427-460         | ATGGCCGTTTCTTCTTGGCTATTGTCACTGCTGG           |
|                        | 2a4U         | 1   | 688-713         | CAGAAGTGAGTCTGGATCAAGCTGCG                   |
|                        | 2aFU4        | 2   | 984-1001        | GTCAATAATGGCTACCGC                           |
|                        | 2a5U         | 1   | 1133-1155       | GGGAGTTCGTGGAGTTGTCGGTC                      |
|                        | 2aT>Af       | 1   | 1214-1240       | GCGTAGTCTGGTTCTgCAATTAAGCC                   |
|                        | 2aJANf       | 1   | 1257-1279       | CCAGCAGTTGAAGCAGGCTGGGC                      |
|                        | 2aJANf link  | 1   | 1257-1279       | cgacgacgacgacgacgacgaCCAGCAGTTGAAGCAGGCTGGGC |
|                        | 2aQ>Lf       | 1   | 1273-1302       | GCTGGGCTTTGAATAAGCtGTTGGATAACC               |
|                        | 2aU11_4U     | 1   | 1369-1394       | CTATGTATCAAgCCTTGGCAGAATCG                   |
|                        | 2a6U         | 1   | 1658-1685       | ACGGGTGATTGATAAGTCTGTAGCTGAC                 |
|                        | 2aU11_5U     | 1   | 1835-1859       | TCCGGATGTAGTGATTAGCCACTGG                    |
|                        | 2a2268r      | 1   | 2299-2267       | AGTTTCTCGAACCAAAACCGCACAAAGCTAGGC            |
|                        | B6_2aR       | 1   | 2204-2167       | GTTTTAGAAAGTTACCAAATAGATTGACTATCGAATCCC      |
|                        | 2aTAAr_Xho1  | 3   | 2195-2173       | ccgctcgagcggTTAGCGAAATAGATTGACTATCG          |
|                        | 2a7R         | 1   | 2020-1992       | GCTGGTGCAATTCATTTTGCTTATAAGC                 |
|                        | 2aFL4        | 2   | 1600-1583       | ATAAAATGAGCTTCAGGC                           |
|                        | 2aQ>Lr       | 1   | 1302-1273       | GGTTATCCAACaGCTTATTCAAAGCCCAGC               |
|                        | 2aJANr       | 1   | 1279-1257       | GCCAGCCTGCTTCAACTGCTGG                       |
|                        | 2aJANr link  | 1   | 1279-1257       | gcccggcctgcccggcggcGCCCAGCCTGCTTCAACTGCTGG   |
|                        | 2aT>Ar       | 1   | 1240-1214       | GGCTTAATTGcAGAACCAGGACTACGC                  |
|                        | 2aTMr        | 3   | 164-143         | TGTTAGATGATAACGACGCCAG                       |
|                        | 2a2R         | 1   | 136-113         | CGAATCGGACCTACTTGGGCTAAT                     |
|                        | <i>bbp2x</i> | pn2xUP  | 1               | 225-250                                      |
| 600R6for               |              | 3   | 713-738         | GGATCGTCTGGGTAATATTGTACCCG                   |
| PM39                   |              | 3   | 1726-1698       | CTCATCGATACAGCCGAGAAAATATAGTC                |
| pn2xDOWN               |              | 1   | 2280-2250       | ggcgAATTCCAGCACTGATGGAATAAACATATTA           |
| <i>ciaR</i>            | ciaR-for     | 3   | (-459)-(-423)   | TTGGCAGCAGCTCTTGCATACAGTACAG                 |
|                        | ciaR-rev     | 3   | 565-537         | ACCGAAATCGTTGTATCACTATCAAATCC                |
| <i>ciaH</i>            | ciaH_for     | 3   | (-103)-(-74)    | TCGGTTGTCAAGTCTATGTTTCAAAGTTC                |
|                        | ciaHseq_for  | 3   | 544-572         | AATTGATTGTGGTCGTGATGGCTAGTTTC                |
|                        | ciaH_rev     | 3   | 1408-1384       | AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG                    |
| Janus-Kassette         | janFOR-link  | 1   | -               | ccgcccggcaggccgcccTATTCCAGAGGAAATGGATCGG     |
|                        | janREV-link  | 1   | -               | tcgtcgtcgtcgtcgtcgtCTTTCCTTATGCTTTTGGACG     |
| <i>pGEM/pGEX/pJDC9</i> | REV-seq      | 1   | -               | AACAGCTATGACCATG                             |
|                        | UP-seq       | 1   | -               | GTAACACGACGGCCAGT                            |
| H = Hersteller         |              | 1 = MWG-Biotech<br>2 = TIB Molbiol. Syntheselabor<br>3 = Operon Biotechnologies |                 |  |

\*Kleinbuchstaben zeigen von der Referenzsequenz abweichende Nukleotide.

## 2.5 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits

Tab. 2.13: Verwendete Geräte

| Gerät                     | Modell           | Firma                                   |
|---------------------------|------------------|---|
| Fluoreszenzscanner        | FluorImager 595  | GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)     |
| Geldokumentationsanlage   | Digit-Store      | INTAS, Göttingen                        |
| Mikrophotometer           | ND-1000          | NanoDrop Technologies, Wilmington (USA) |
| Mikroskop                 | Eclipse E600     | Nikon GmbH, Düsseldorf                  |
| Nephelometer              | Digital Unigalvo | Diffusion Systems, London (UK)          |
|                           | MTS 4            | IKA Labortechnik, Staufen i.Br.         |
|                           | UNO-Thermoblock  | Biometra, Göttingen                     |
| Ultraschall-Desintegrator | Sonifier B12     | Branson Ultrasonic, Danbury (USA)       |
| Zentrifugen               | 5415C            | Eppendorf, Hamburg                      |
|                           | Biofuge 28RS     | Heraeus Sepatech, Osterode              |
|                           | Biofuge Stratos  | Heraeus Sepatech, Osterode              |
|                           | J2-21            | Beckman, Fullerton (USA)                |
|                           | RC 5B Plus       | Sorvall (Du Pont)                       |

Tab. 2.14: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie   | Firma                                       |
|--|---|
| Glutamin, L-Cystein, Uridin, Ca-Pantothenat, BSA   | AppliChem, Darmstadt                        |
| Casaminoacids, Neopepton, Hefeextrakt, Bactopepton   | Becton, Dickinson and Company, Sparks (USA) |
| LE Agarose   | Biozym, Hessisch Oldendorf                  |
| 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), 2-Mercaptoethanol, Acrylamid, Bisacrylamid                | Carl Roth, Karlsruhe                        |
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)   | Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)               |
| GSH-Sepharose, PD10 Gelfiltrationssäulen, HiTrap NHS-Säulen  | GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)         |
| Competence stimulating peptide (CSP)   | Institut für med. Immunologie, Berlin       |
| Ethanolamin  | Merck, Darmstadt                            |
| Bocillin FL  | Mobitec, Göttingen                          |
| Defibriniertes Schafsblut, Milchpulver   | Oxoid, Wesel                                |
| L-Tryptophan, Adenosin, Biotin, Thiamin-HCl, Riboflavin, Nicotinsäure                              | Sigma-Aldrich, München                      |
| Nicht weiter spezifizierte Chemikalien wurden bei Carl Roth, Sigma-Aldrich oder AppliChem bezogen. |   |

Tab. 2.15: Verwendete Enzyme

| Enzym   | Firma   |
|---|---|
| iProof Polymerase   | Bio-Rad, Hercules (USA)                                   |
| Proteinase K  | Carl Roth, Karlsruhe                                      |
| RedGoldstar Polymerase  | Eurogentec, Seraing (Belgien)                             |
| Cellosyl  | freundliche Gabe von Gerhard Seibert (Aventis, Frankfurt) |
| PreScission Protease  | GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)                       |
| <i>EcoR</i> 1, <i>Xho</i> 1, T4 Polynukleotid-Kinase            | NEB, Ipswich (USA)  |
| RNAse   | Qiagen, Hilden  |
| <i>Bam</i> H1, <i>Bst</i> E2, SuRE/Cut Buffer H,T4 DNA-Ligase   | Roche Diagnostics, Mannheim                               |
| Lysozym, Anti-rabbit IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase | Sigma-Aldrich, München                                    |

Tab. 2.16: Verwendete Kits und Standards

| Verwendung              | Kit   | Firma                                 |
|-------------------------|---|---------------------------------------|
| DNA-Längenstandard      | GeneRuler 1kb                               | Fermentas, Burlington (CAN)           |
| DNA-Sequenzierung       | Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 1.1 | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Gelextraktion           | NucleoSpin Extract II                       | Macherey-Nagel, Düren                 |
| PCR-Aufreinigung        | Jetquick                                    | Genomed, Löhne                        |
| Plasmid-Minipräparation | Qiaprep                                     | Qiagen, Hilden                        |
| Protein-Längenstandard  | LMW-SDS Marker Kit                          | GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)   |
| Protein-Längenstandard  | Benchmark Protein ladder                    | Invitrogen GmbH, Darmstadt            |

Tab.2.17: Verwendete spezifische Software

| Einsatzgebiet  | Software    | Hersteller                  |
|--|-------------|-----------------------------|
| Proteinmengenberechnung anhand der optischen Dichte;         | Protean     | DNASTAR Inc., Madison (USA) |
| Quantifizierung der Intensität Bocillin-gefärbter PBP-Banden | Scion-Image | Scioncorp, Frederick (USA)  |

## **3. Methoden**

### **3.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **3.1.1 Glycerin-Dauerkulturen**

Exponentiell wachsenden Bakterien-Flüssigkulturen wurden 1 ml-Aliquots entnommen, in einem Schraubdeckel-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl Glycerin (98%) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **3.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen**

Für Versuche mit Kulturen in Flüssigmedium wurden Vorkulturen angelegt, die am Vortag aus Glycerinkulturen oder von Blutagar-Platten angeimpft wurden. Diese wurden in einem Eiswasserbad gekühlt und durch eine Zeitschaltuhr um ca. 4.00 Uhr auf 37°C gewärmt. Am Morgen wurde aus diesen, noch exponentiell wachsenden Kulturen, vorgewärmtes Medium mit einer Verdünnung von mindestens 1:20 angeimpft.

Der Wachstumsverlauf dieser 10ml-Kulturen wurde mit dem Nephelometer kontrolliert. Die gemessenen Werte ([N], logarithmische Skala) wurden gegen die Zeit aufgetragen. Im linearen Bereich der Kurve (exponentielles Wachstum) wurden Messpunkte ( $x_0$  &  $x_t$ ) gewählt zur Bestimmung von Wachstumsrate sowie Generationszeit herangezogen.

Für Übernacht-Kulturen von *E. coli* wurden 2 ml LB-Medium mit einer Kolonie oder 20 µl Glycerinkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für Kulturen  $\geq 1$  l wurde eine 100ml Zwischenkultur angelegt, aus der dann weiter überimpft wurde. Der Wachstumsverlauf von *E. coli*-Kulturen wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt.

#### **3.1.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Die Standardmethode zur Bestimmung der MHK bei *S. pneumoniae* wird mit Verdünnungsreihen des Antibiotikums durchgeführt, bei denen 2-fache Verdünnungsschritte verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit war es notwendig, die MHK präziser zu bestimmen, da die Cefotaxim-MHK Werte für die einzelnen Mutanten zum Teil relativ eng beieinander lagen. Daher wurden sie auf Platten mit einer engen Konzentrationsreihe des Antibiotikums bestimmt.



Hierzu wurden 97ml D-Agar mit einer Temperatur von 52°C mit 3 ml Schafsblut und 20-200 µl einer entsprechenden Verdünnung des Antibiotikums gemischt und auf zwei Viereck-Petrischalen verteilt.

Exponentiell wachsende *S. pneumoniae*-Kulturen ( $\approx$  N30 - N50) wurden 1:200 in CpH8 verdünnt, anschließend 25 µl dieser Suspension auf die MHK-Platten getropft und unter der Sterilbank getrocknet. Nach einer Inkubationszeit von 24h bei 37°C wurde das Experiment ausgewertet. Die minimale Hemmkonzentration ist die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum zu beobachten ist. Nach der 24h-Kontrolle wurden die Agar-Platten weiter inkubiert um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Bei mehreren Wiederholungen der MHK-Bestimmung für einen Stamm wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der erhaltenen Daten bestimmt.

#### 3.1.4 Präparation chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zu Präparation chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* beruht auf der von Marmur (Marmur, 1961) publizierten Vorschrift.

2 ml Kultur wurden ungefähr bei N 80 durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT in Eppendorf-Reaktions-Gefäßen (ERG) mit der Tischzentrifuge 5415C geerntet. Das Sediment wurde mit 2 ml eiskalter NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen, wobei die Zellen wiederum bei 14.000 rpm abzentrifugiert wurden. Die in 180 µl TE-Puffer resuspendierten Sedimente wurden mit RNase-Lösung (20 µl, 10 mg/ml) und 200 µl SDS (2%) gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 2 Minuten folgte die Zugabe von 100 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und eine weitere 10-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde dieser Ansatz zweimal einer Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1, äquilibriert mit TE-Puffer) unterzogen. 500µl der Mischung wurden dem Lysat hinzugefügt und das Eppendorfgefäß anschließend 30 min mit dem Mixer bei Raumtemperatur (RT) gerüttelt. Durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die wässrige Oberphase von der organischen Unterphase getrennt. Die Oberphase wurde vorsichtig abgehoben und einer zweiten Extraktion (20 min rütteln) unterzogen. Die wässrige Phase wurde 10 min bei RT mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Die ausgefallene DNA wurde 5 min bei 14.000 rpm sedimentiert und nach Entfernen des Überstandes zweimal mit EtOH 100 % gewaschen. Das gewaschene Sediment wurde im Exsikkator getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Abschließend wurde Qualität und die ungefähre Quantität der Präparation durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Tab. 3.1: TE-Puffer

| Bestandteil       | Menge |
|-------------------|-------|
| 1 M Tris HCl pH 8 | 1 ml  |
| 0,1 M EDTA pH 8   | 1 ml  |
| H <sub>2</sub> O  | 98 ml |
| > autoklaviert    |       |

### 3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) ist die am häufigsten verwendete Methode zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA. Auf diesem Prinzip basiert auch das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Protokoll.

1,5 ml über Nacht gewachsene *E. coli*-Kultur wurden in einem ERG für 1 min zentrifugiert (wie bei allen Schritten dieses Protokolls bei 14.000 rpm und Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl Lösung 1 mit Lysozym resuspendiert und 10 min auf Eis gehalten. Nach der Zugabe von 200 µl Lösung 2 und gründlicher Durchmischung durch Invertieren folgten weitere 5 min auf Eis. Zu diesem Gemisch wurden 200 µl eisgekühlte Lösung 3 zugefügt, abermals mittels Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Hochmolekulare chromosomale DNA, Protein-SDS-Kalium-Komplexe sowie weitere unlösliche Zellbestandteile wurden 15 min mit der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in einem neuen ERG mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte 5-minütiges Zentrifugieren. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, bevor das Sediment bei 37°C für 10 min in 200 µl Lösung 4 mit RNase gelöst wurde. Dieses Gemisch wurde mit 200 µl P/C/I-Lösung extrahiert (siehe 3.1.5), anschließend nach Zugabe von 0,5 ml Ethanol *p.a.* und gründlichem Mischen für 5 min auf Eis gefällt. Der Fällungs-Ansatz wurde 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit zweimal 200 µl Ethanol gewaschen. Im Exsikator wurde das die Plasmide enthaltende Sediment 20 min getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst, die Qualität und Quantität der Präparation durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Tab 3.2: Lösungen für die Plasmid-Präparation.

|                      | Bestandteil                         | Menge     |  |
|----------------------|-------------------------------------|-----------|--|
| Lösung 1             | Saccharose                          | 30 g      |  |
|                      | 1 M Tris HCl                        | 2,5 ml    |  |
|                      | 0,1 M EDTA                          | 10 ml     |  |
|                      | H <sub>2</sub> O                    | 60 ml     |  |
|                      | > pH 8 mit HCl eingestellt          |           |  |
|                      | H <sub>2</sub> O                    | ad 100 ml |  |
| Lösung 1 mit Lysozym | Lösung 1                            | 1 ml      |  |
|                      | Lysozym                             | 20 mg     |  |
|                      | > gemischt und zeitnah verwendet    |           |  |
| Lösung 2             | 1 M NaOH                            | 1 ml      |  |
|                      | 2% SDS in H <sub>2</sub> O          | 1 ml      |  |
|                      | > gemischt und zeitnah verwendet    |           |  |
| Lösung 3             | 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8           |           |  |
| Lösung 4             | 1 M Tris HCl                        | 5 ml      |  |
|                      | 1 M Natriumacetat                   | 10 ml     |  |
|                      | H <sub>2</sub> O                    | 60ml      |  |
|                      | > pH 7,5 mit Essigsäure eingestellt |           |  |
|                      | H <sub>2</sub> O                    | ad 100 ml |  |
| Lösung 4 mit RNase   | Lösung 4                            | 1 ml      |  |
|                      | RNase A (100 mg/ml)                 | 1 µl      |  |
|                      | > gemischt und zeitnah verwendet    |           |  |

Bereits definierte Plasmide oder solche, die in Sequenzreaktionen eingesetzt werden sollten, wurden mit dem Qiaprep-Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

### 3.1.6 Transformation von *S. pneumoniae*

Als natürlich kompetentes Bakterium ist *S. pneumoniae* während einer Phase seines Wachstums in der Lage DNA aufzunehmen (Tomasz und Hotchkiss, 1964). Diese kompetente Phase variiert von Stamm zu Stamm. Daher musste bei den verwendeten Mutanten diese jeweils neu bestimmt werden, um optimierte Transformationsergebnisse zu erhalten.

10 ml CpH8-Medium wurden mit 45 µl 16%iger BSA-Lösung versetzt und wie unter 3.1.2 beschrieben beimpft und inkubiert. Ab einer Kulturtrübung von N=20 wurden in kurzen Zeitabständen Aliquots zu je 200µl entnommen, als Glycerinkultur konserviert und auf Kompetenz getestet.

Tab. 3.3: Ansatz zur Transformation von *S. pneumoniae*

| Komponente   | Menge      |
|--|------------|
| kompetente Zellen  | 20 µl      |
| CpH8 (+ 0,72% BSA)   | 180 µl     |
| DNA  | ca. 300 ng |
| Bei Transformationen mit Kompetenz-defizienten <i>S. pneumoniae</i> -Stämmen wurde dem Ansatz 20 ng CSP zugesetzt. |            |

Der in Tab. 3.3 beschriebene Ansatz wurde für 30 min bei 30°C und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit CpH8-Medium verdünnt und je 100µl einer geeigneten Verdünnung auf D-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert. Kontrollansätze zur Titerbestimmung wurden ohne Antibiotikum ausplattiert. Die beimpften Blutagar-Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend ausgezählt.

Die Transformationen zur Bestimmung der kompetenten Phase wurden mit chromosomaler DNA des Stamms *S. p.* AmiA9 durchgeführt. Dieser Stamm ist durch eine Punktmutation in *str41* (A<sub>167</sub>C) Streptomycin-resistent. Somit ist eine Selektion von Transformanten bei 200 µg Streptomycin pro ml Medium möglich. Die Transformationseffizienz wurde als prozentualer Anteil der selektierten Transformanten an der Lebendkeimzahl bestimmt.

### 3.1.7 Transformation von *E. coli*

Da *E. coli* im Gegensatz zu *S. pneumoniae* kein natürlich kompetentes Bakterium ist bedarf es einer chemischen und physikalischen Behandlung der Zellen, um eine Aufnahme von DNA zu erreichen. Neben der Elektroporation sind die Calciumchlorid- und die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Rubidiumchloridmethode (Hanahan, 1983) die am weitesten verbreiteten Protokolle.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur beimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert.

Die Kultur wurde dann auf Eis gestellt, 30 ml entnommen und diese bei 4°C und 12.000 rpm für 10 min im vorgekühlten SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml kaltem Transformationspuffer 1 resuspendiert. Nach 90-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension wie im ersten Schritt zentrifugiert. Nun wurde das Sediment in 1 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden in 100 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Transformationsexperiment gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot langsam auf Eis aufgetaut und dann mit der zu transformierenden DNA (5 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid) gemischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 90 s auf 42°C erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Zur phänotypischen Expression wurde 1ml LB-Medium zugesetzt, diese Verdünnung in ein steriles Reagenzglas überführt und 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 µl wurden anschließend auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Der Transformationsansatz wurde für eventuell nötige Verdünnungen bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 3.4: Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

|                         | Bestandteil                         | Menge     |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Transformationspuffer 1 | 1 M RbCl                            | 10 ml     |
|                         | 1 M MnCl <sub>2</sub>               | 5 ml      |
|                         | 1 M Kaliumacetat                    | 3 ml      |
|                         | 1 M CaCl <sub>2</sub>               | 1 ml      |
|                         | Glycerin 98%                        | 15 ml     |
|                         | H <sub>2</sub> O                    | 50 ml     |
|                         | > pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt |           |
|                         | H <sub>2</sub> O                    | ad 100 ml |
|                         | > sterilfiltriert                   |           |
| Transformationspuffer 2 | 1 M MOPS                            | 1 ml      |
|                         | 1 M RbCl                            | 1 ml      |
|                         | 1 M CaCl <sub>2</sub>               | 7,5 ml    |
|                         | Glycerin 98%                        | 15 ml     |
|                         | H <sub>2</sub> O                    | 50 ml     |
|                         | > pH 8 mit Natronlauge eingestellt  |           |
|                         | H <sub>2</sub> O                    | ad 100 ml |
|                         | > autoklaviert                      |           |

### 3.1.8 Blau / Weiß-Selektion

Die Multiple-Cloning-Site (MCS) der verwendeten Vektoren liegt am Anfang des *lacZ'*-Gens. Ohne Unterbrechung durch ein kloniertes DNA-Fragment bleibt die in *lacZ'* codierte C-Terminale teil der β-Galaktosidase funktional.

Gemeinsam mit den vom Wirtstamm produzierten restlichen Bestandteilen kann die somit intakte β-Galaktosidase das dem Medium zugesetzte Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid X-Gal umsetzen. X-Gal ist ein chromogenes Substrat für die β-Galaktosidase, welches durch Hydrolyse einen blauen Farbstoff bildet, der die Kolonien von *E. coli*-Klonen mit Vektoren ohne aufgenommenes Fragment färbt. Die Induktion der

*lacZ'*-Produktion durch das Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranosid (IPTG) im Medium verstärkt diesen Effekt. Wird *lacZ'* durch eingefügte DNA-Fragmente unterbrochen, belieben die entsprechenden Kolonien weiß (Sambrook *et al.*, 2001).

X-Gal wurde dem LB-Agar mit einer Endkonzentration von 80  $\mu$ g/ml, IPTG mit 0,5 $\mu$ g/ml zugesetzt. Die Zugabe erfolgte nach dem Abkühlen des Agars auf 52°C.

Tab. 3.5: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)-Lösung (5%)

| Bestandteil                           | Menge   |
|---------------------------------------|---------|
| X-Gal                                 | 100 mg  |
| Dimethyl-Formamid                     | ad 2 ml |
| > gemischt, dunkel bei -20°C gelagert |         |

Tab. 3.6: Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung (0,5 M)

| Bestandteil                    | Menge    |
|--------------------------------|----------|
| IPTG                           | 1,2 g    |
| H <sub>2</sub> O               | ad 10 ml |
| > gemischt, bei -20°C gelagert |          |

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase Kettenreaktion

Die von K. B. Mullis entwickelte Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist die Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986). Mit ihr können Bereiche zwischen zwei Oligonukleotidprimern, deren Komplementärsequenz bekannt sein muss, vervielfältigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen hierzu zwei unterschiedliche Polymerasen zum Einsatz:

Zur Generierung von PCR-Produkten als Matrize für Sequenzreaktionen, zur Größenüberprüfung von DNA-Abschnitten und zum Erstellen von Inserts für TA-Klonierungen wurde die RedGoldstar Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym besitzt keine 3'-5' Korrekturlesefunktion und weist dadurch eine Fehlerrate von  $1 / 5 \times 10^5$  Basen auf. Durch eine Extendase-Aktivität wird unabhängig vom amplifizierten Bereich am 3'-Ende des Produkts ein Adenosin angehängt, wodurch eine Ligation in den Vektor pGEM T-easy ermöglicht wird.

Im Gegensatz zur RedGoldstar besitzt die iProof Polymerase eine 3'-5' Korrekturlesefunktion, was sich in einer niedrigeren Fehlerrate niederschlägt ( $1/2,2 \times 10^6$  Basen). Bei Transformationen und Klonierungen (außer TA-Klonierungen) kamen PCR-Produkte zum Einsatz, die mit diesem Enzym synthetisiert wurden.

Alle PCR-Produkte, die in weitere Reaktionen mit einer DNA-Polymerase eingingen, z.B. Sequenzierung oder überlappende PCR, wurden zuvor mit dem Jetquick-Kit gereinigt. Nach jedem Schritt, d.h. sowohl Synthese als auch Aufreinigung folgte eine Überprüfung des Ergebnisses mittels Agarosegel-Elektrophorese.

Als Template-DNA wurden neben PCR-Produkten, Plasmiden und chromosomaler DNA z.T. auch direkt Bakterien eingesetzt. Für diese Zell-PCR wurden 200  $\mu$ l Kultur (ca. N=50) bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert. 2  $\mu$ l dieser Suspension wurden als Template eingesetzt.

Tab. 3.7: Komponenten einer PCR-Reaktion mit der RedGoldstar Polymerase

| Komponente                        | Konzentration | eingesetzte Menge |
|-----------------------------------|---------------|-------------------|
| Primer 1                          | 5 pmol/µl     | 1 µl              |
| Primer 2                          | 5 pmol/µl     | 1 µl              |
| PCR-Puffer                        | 10-fach       | 5 µl              |
| dNTPs                             | 10 mM         | 2 µl              |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 25 mM         | 8 µl              |
| template DNA                      | variabel      | 0,5-2 µl          |
| Red Goldstar-Polymerase           | 5 U/µl        | 0,5 µl            |
| H <sub>2</sub> O                  |               | ad 50 µl          |
| > gemischt und kurz zentrifugiert |               |                   |

Tab. 3.8: Programm für PCR-Reaktionen mit der RedGoldstar Polymerase

|   | Dauer    | Temperatur | Schritt                |
|---|----------|------------|------------------------|
| 1 | 2 min    | 96°C       | initiale Denaturierung |
| 2 | 30 s     | 96°C       | Denaturierung          |
| 3 | 30 s     | X°C*       | Annealing              |
| 4 | 1 min/kb | 72°C       | Elongation             |
| 5 | 10 min   | 72°C       | finale Elongation      |
| 6 | ∞        | 10°C       | Lagerung               |

} 30 ×

\*abhängig von der Schmelztemperatur der Primer; Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Temperatur ca. 10°C, mindestens jedoch 5°C, unter der Schmelztemperatur der Primer angesetzt.

Tab. 3.9: Komponenten einer PCR-Reaktion mit der iProof-Polymerase

| Komponente                          | Konzentration | eingesetzte Menge |
|-------------------------------------|---------------|-------------------|
| Primer 1                            | 5 pmol/µl     | 5 µl              |
| Primer 2                            | 5 pmol/µl     | 5 µl              |
| HF-Puffer                           | 5-fach        | 10 µl             |
| dNTPs                               | 10 mM         | 1 µl              |
| template DNA                        | variabel      | 0,5-2 µl          |
| iProof-Polymerase                   | 2 U/µl        | 0,5 µl            |
| H <sub>2</sub> O                    |               | ad 50 µl          |
| > gemischt und kurz abzentrifugiert |               |                   |

Tab. 3.10: Programm für PCR-Reaktionen mit der iProof Polymerase

|   | Dauer   | Temperatur | Schritt                |
|---|---------|------------|------------------------|
| 1 | 30 s    | 98°C       | initiale Denaturierung |
| 2 | 10 s    | 98°C       | Denaturierung          |
| 3 | 30 s    | X°C*       | Annealing              |
| 4 | 30 s/kb | 72°C       | Elongation             |
| 5 | 10 min  | 72°C       | finale Elongation      |
| 6 | ∞       | 10°C       | Lagerung               |

} 30 ×

\*abhängig von der Schmelztemperatur der Primer; Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Temperatur ca. 10°C, mindestens jedoch 5°C, unter der Schmelztemperatur der Primer angesetzt.



### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten, der Qualität einer Präparation und zur Abschätzung der DNA-Konzentration einer Probe wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

Durch ihre negative Ladung wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode. Geschieht dies in einem Agarosegel wandern die Nukleinsäuren je nach Fragmentgröße unterschiedlich schnell und werden so aufgetrennt. Mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden und interkallierenden Agens, werden Nukleinsäuren anschließend mit UV-Licht sichtbar gemacht (LePecq und Paoletti, 1967).

Tab. 3.11: TEE-Puffer

|                | Komponente       | Menge       |
|----------------|------------------|-------------|
| 50× TEE-Puffer | Tris             | 242 g       |
|                | Essigsäure       | 57,1 ml     |
|                | 0,5M EDTA pH 8   | 100 ml      |
|                | H <sub>2</sub> O | ad 1.000 ml |
| 1× TEE-Puffer  | 50× TEE-Puffer   | 100 ml      |
|                | H <sub>2</sub> O | 4900 ml     |

Tab 3.12: 6× DNA Probenpuffers

| Komponente       | Menge     |
|------------------|-----------|
| Bromphenolblau   | 0,25 g    |
| Xylen Cyanol FF  | 0,25 g    |
| Glycerin         | 30 ml     |
| H <sub>2</sub> O | ad 100 ml |

Agarose und TEE-Puffer (z.B. 0,8g Agarose und 80 ml TEE für ein 1%iges Gel) wurden gemischt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine schlierenfreie Lösung entstand. Mit dieser Lösung wurde eine vorbereitete und mit einem Kamm bestückte Gelkammer ca. 6 mm hoch befüllt. Nachdem das Gel abgekühlt und somit geliert war, wurde es mit TEE-Puffer überschichtet. Die durch den herausgezogenen Kamm entstandenen Taschen wurden mit den Proben gefüllt. Diese bestanden aus der zu analysierenden DNA und 6× DNA Probenpuffer (1/5 des Volumens der DNA-Lösung). Je nach Experiment wurden zusätzliche Taschen mit Längenstandard und/oder definierten Mengen pBR322 als Konzentrationsmarker befüllt.

Präparative Gele, bei denen einzelne Banden eines Restriktionsverdau oder einer PCR aufgereinigt wurden (NucleoSpin Extract II), hatten eine Agarosekonzentration von 0,7%. Alle anderen Gele wurden mit 1% Agarose im TEE-Puffer gegossen.

Bei angelegten 120 V wurde die Elektrophorese so lange durchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande fast das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel für 15-20 min in einem Bad mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt, mit Wasser gespült und dann unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) betrachtet. Die Ergebnisse wurden mit der Geldokumentationsanlage festgehalten.

### 3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Neben der Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarosegel-Elektrophorese, wurde diese, sofern für weitere Experimente notwendig, photometrisch bestimmt. Hierzu wurde 1 µl der zu analysierenden Lösung oder eine 1:10-Verdünnung gegen Wasser gemessen. Die Software des Mikrophotometers rechnet die bei einer Wellenlänge von 260 nm erhaltenen Werte direkt in Nukleinsäurekonzentrationen um.

### 3.2.4 Restriktion

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen Sequenzen. Dabei werden Enden produziert, die für das jeweilige Enzym charakteristisch sind. Beispielsweise lautet die Erkennungssequenz für *EcoR1* GAATTC, wobei nach der Restriktion ein 4 Basen langer Überhang (3'-TTAA-5') entsteht. So geschnittene Fragmente können mittels Ligation (siehe 3.2.5) miteinander verknüpft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen die Restriktionsendonukleasen *EcoR1*, *Xho1*, *BamH1* und *BstE2* zum Einsatz.

Tab 3.13: Komponenten einer Restriktionsreaktion

| Komponente                            | Menge (analytisch) | Menge (präparativ) |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 10× Restriktionspuffer                | 1 µl               | 2,5 µl             |
| Plasmid                               | 3-5 µl             | 5-10 µl            |
| Enzym                                 | 5 Units            | 10 Units           |
| H <sub>2</sub> O                      | ad 10 µl           | ad 25 µl           |
| > gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert |                    |                    |

Der 10 µl-Ansatz wurde zur Analyse neuer Konstrukte, der 25 µl-Ansatz für präparative Gele verwendet. Alle Restriktionen wurden bei 37°C inkubiert und nach 1 h mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Gegebenenfalls wurden einzelne Banden extrahiert.

### 3.2.5 Ligation

Durch die DNA-Ligase werden 5'- und 3'-Enden von DNA-Molekülen unter ATP-Verbrauch über Phosphodiesterbindungen verknüpft. Fragmente, die zueinander passende Moleküleenden (beispielsweise nach Restriktion) besitzen, können so verbunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ligationsreaktionen benutzt, um bei Klonierungen Vektor und Insert-Moleküle zusammenzufügen.

Tab. 3.14: Standard-Ligationsansatz

| Komponente   | Menge         |
|--|---------------|
| T4-DNA-Ligase -Puffer (2×)                             | 10 µl         |
| T4-DNA-Ligase  | 1 µl          |
| Insert   | ca. 0,25 pmol |
| Vektor   | ca. 0,05 pmol |
| H <sub>2</sub> O                                       | ad 20 µl      |
| > gemischt und 1 h bei RT (oder ÜN bei 16°C) inkubiert |               |

### 3.2.6 Phosphorylierung

DNA-Moleküle müssen vor einer Ligation an den 5'-OH-Enden phosphoryliert werden, da Ligasen einen 5'-Phosphatrest benötigen. Verwendet wurde hierfür die T4-Polynukleotidkinase, die diese Reaktion unter ATP-Verbrauch katalysiert.

Tab. 3.15: Phosphorylierungsreaktion

| Komponente   | Menge              |
|--|--------------------|
| 10× T4 Polynukleotidkinase-Puffer  | 4 µl               |
| T4 Polynukleotidkinase   | 2 µl               |
| ATP 0,1M   | 1 µl               |
| DNA-Lösung   | 33 µl (ca. 200 ng) |
| > gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert, mit dem Jetquick-Kit aufreingt |                    |

### 3.2.7 DNA-Sequenzanalyse

Zur Kontrolle von Plasmid-Inserts und Transformanten, sowie zur Analyse der *pbp2a*-Gene klinischer Isolate wurden DNA-Sequenzen nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) untersucht. Die Methode beruht darauf, dass in einer Polymerase-Reaktion neben normalen Nukleotidmonomeren auch deren unterschiedlich markierte Didesoxy-Varianten eingesetzt werden. Wird die Didesoxy-Variante eingebaut, stoppt die Synthese dieses Stranges. Bei der Auftrennung dieses Gemisches über ein Polyacrylamidgel kann nun eine Lauflänge einem bestimmten Nukleotid zugeordnet werden.

Zur Durchführung dieser Reaktionen wurde das Big Dye Terminator Kit v1.1 verwendet. Als Template-DNA für die Sequenzreaktionen dienten aufgereinigte PCR-Fragmente oder Plasmide, die mit dem Qiaprep-Kit isoliert wurden.

Nach der Sequenzreaktion wurden die Proben im Nano-Bio-Center der TU-Kaiserslautern gereinigt und mit dem Kapillarsequenzierer ABI 3100 von Applied Biosystems analysiert.

Die *pbp2a*-Nukleotidsequenz der mit Cefotaxim selektionierten *pbp2a*-Transformanten erfolgte durch die AGOWA GmbH, Berlin.

Tab. 3.16: Komponenten der Sequenzreaktionen für PCR-Produkte und Plasmide

| Komponente                          | Menge (PCR) | Menge(Plasmid) |
|-------------------------------------|-------------|----------------|
| Primer (5 pmol/μl)                  | 1 μl        | 1 μl           |
| Big Dye Terminator Mix v1.1         | 1 μl        | 2 μl           |
| Template DNA                        | 1 μl        | 7 μl           |
| H <sub>2</sub> O                    | 7 μl        | -              |
| > gemischt und kurz abzentrifugiert |             |                |

Tab. 3.17: Programm für die Sequenzreaktion\*

|   | Dauer | Temperatur | Schritt       |
|---|-------|------------|---------------|
| 1 | 10 s  | 96°C       | Denaturierung |
| 2 | 5 s   | 50°C       | Annealing     |
| 3 | 4 min | 60°C       | Elongation    |
| 4 | ∞     | 4°C        | Lagerung      |

} 25 ×

\*für die Sequenzierung von Plasmiden wurde zu Beginn des Programms eine initiale Denaturierung von 5 min bei 96°C eingefügt.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Standardmethode zur Auftrennung von Proteinproben ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Hierbei werden Proteine durch kurzes Aufkochen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Dieses anionische Detergenz überdeckt die Eigenladungen von Proteinen und ermöglicht so eine Auftrennung, die nahezu unabhängig von der Proteinladung ist. Beim der Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel hin zu Anode, werden diese somit fast nur nach Molekulargewicht getrennt. Anschließend können die Proteine mittels Coomassie-Färbung, Western Blot oder bei Bocillin-markierten Proben mit dem FluorImager analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei Gelsysteme zum Einsatz: Eine Spezialanfertigung mit 13 cm hohen Glasplatten, 1,1 mm-Spacern und passenden Kunststoff-Gelkammern, sowie das MiniPROTEAN-System von BioRad mit 0,75 mm-Spacern. Nach dem Zusammenbau von Glasplatten und Spacern wurde dieses abgedichtete Sandwich mit frisch gemischtem Trenngel bis ca. 1 cm unter die Höhe der späteren Probetaschen befüllt. Anschließend wurde das Trenngel ca. 2 mm mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, welches nach 1 h Polymerisation des Gels entfernt wurde. Die Art des Trenngels wurde durch die jeweiligen Proben und Analyseverfahren bestimmt. Zur Kontrolle von Protein- und Antikörperreinigung wurden 11%ige, zur Analyse von *S. pneumoniae* -Lysaten 7,5% Gele benutzt. Zur optimierten Auftrennung des PBP2xab-Triplets bei Bocillin-markierten Proben kamen Gele mit einem modifizierten Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis zum Einsatz (Hakenbeck *et al.*, 1988).

Das in allen Fällen 5%ige Sammelgel wurde auf das Trenngel bis zur Oberkante der Glasplatte gegossen und der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach einer Stunde Polymerisation konnte der Kamm gezogen, das Gel in die entsprechende Apparatur eingebaut und der Laufpuffer eingefüllt werden.

Proteinproben wurden mit dem mindestens 1,5-fachen Volumen an Probenpuffer in einem ERG gemischt und 2 min bei 96°C aufgeköcht. Danach wurden die Proben 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die im Probenpuffer gelösten Proteine auf das Gel geladen. Zur Größenbestimmung einzelner Banden wurde parallel zu den Proben ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

An das Gel wurde eine Spannung von 90 V im Sammelgel, bzw. 200 V im Trenngel angelegt. Nachdem das Bromphenolblau das untere Gelende erreicht hatte, wurde das Gel entnommen und mittels Coomassie-Färbung, Western Blot oder mit dem FluorImager analysiert.

Tab 3.18: Komponenten der verwendeten Trenngele

| Komponente  | 7,5%ig | 11%ig   | PBP2xab-Auftrennung |
|---|--------|---------|---------------------|
| H <sub>2</sub> O  | 9,7 ml | 7,28 ml | 10,5                |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)   | 5 ml   | 7,32 ml | -                   |
| 30% Acrylamid   | -      | -       | 5 ml                |
| 2% Bisacrylamid   | -      | -       | 2,75 l              |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8   | 5 ml   | 5 ml    | 5 ml                |
| 10 % SDS  | 200 µl | 200 µl  | 200 µl              |
| 10 % Ammoniumpersulfat  | 100 µl | 100 µl  | 100 µl              |
| Tetramethylethyldiamin (Temed)  | 10 µl  | 10 µl   | 10 µl               |
| > gemischt, sofort gegossen und mit H <sub>2</sub> O-gesättigtem Buthanol überschichtet |        |         |                     |

Tab. 3.19: Komponenten des 5%igen Sammelgels

| Komponente                      | Menge  |
|---------------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O                | 5,7 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) | 1,7 ml |
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8           | 2,5 ml |
| 10 % SDS                        | 100 µl |
| 10 % Ammoniumpersulfat          | 50 µl  |
| Tetramethylethyldiamin (Temed)  | 5 µl   |
| > gemischt und sofort gegossen  |        |

Tab. 3.20: Laufpuffer für die SDS-PAGE

| Komponente                                       | Menge       |
|--|-------------|
| Tris   | 30 g        |
| Glycin   | 144 g       |
| SDS  | 10 g        |
| H <sub>2</sub> O                                 | ad 2.000 ml |
| > vor Gebrauch 1:5 mit H <sub>2</sub> O verdünnt |             |

Tab. 3.21: Probenpuffer für die SDS-PAGE

| Komponente                       | Menge  |
|----------------------------------|--------|
| 0,5 M Tris/HCl pH 6,8            | 10 ml  |
| 10 % SDS                         | 7,5 ml |
| 98 % Glycerin                    | 7,5 ml |
| Bromphenolblau                   | 1,5 mg |
| β-Mercaptoethanol                | 10 ml  |
| > in Aliquots bei -20°C gelagert |        |

### 3.3.2 Coomassie-Färbung

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mittels Färbung visualisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit kam hierzu die Coomassie-Färbung zum Einsatz. Das Grundprinzip dieser Methode besteht darin, dass sich der Farbstoff an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren anlagert und diese somit, nach entfernen überschüssiger Farbe, sichtbar macht.

Die Gele wurden hierzu über Nacht in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde entfernt und durch Entfärber 1 ersetzt. Dieser wurde nach 30 min gegen Entfärber 2 ausgetauscht. In dieser Lösung wurde das Gel geschwenkt, bis die Hintergrundfärbung ausreichend entfernt worden war. Zur optimierten Kontrasterzeugung geschah dies über mehrere Tage bei gelegentlichem Entfärberaustausch.

Das fertig ge- und entfärbte Gel wurde fotografisch unter Durchlicht dokumentiert.

Tab. 3.22: Coomassie-Färbelösung

| Komponente   | Menge       |
|--|-------------|
| Coomassie R-250  | 2 g         |
| Coomassie G-250  | 50 mg       |
| Methanol   | 500 ml      |
| Essigsäure   | 100 ml      |
| H <sub>2</sub> O   | ad 1.000 ml |
| > über Nacht in einem verschlossenen Gefäß rühren, anschließend filtrieren |             |

Tab. 3.23: Entfärber für die Coomassie-Färbung

|             | Komponente       | Menge       |
|-------------|------------------|-------------|
| Entfärber 1 | Methanol         | 500 ml      |
|             | Essigsäure       | 100 ml      |
|             | H <sub>2</sub> O | ad 1.000 ml |
| Entfärber 2 | Methanol         | 100 ml      |
|             | Essigsäure       | 50 ml       |
|             | H <sub>2</sub> O | ad 1.000 ml |

### 3.3.3 Lysate von *S. pneumoniae* und *S. mitis*

Bei PBP-Bindungsstudien und Western-Blot-Experimenten ist es wichtig einheitliche Mengen von Zellysaten auf die SDS-Gele aufzutragen, um Aussagen über Unterschiede in den Bindungseigenschaften zwischen den einzelnen Proben treffen zu können. Lysate wurden daher standardmäßig aus 2 ml Aliquots von *S. pneumoniae*-Kulturen gewonnen, die bis ca. N=80 gewachsen waren, wurden. Die Sedimente der bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugierten Proben wurden bei -80°C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurden diese in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 resuspendiert, so dass 5 µl Suspension 1 ml Kultur bei N=20 entsprachen. Die so gewonnenen Proben werden im Folgenden als Standardprobe bezeichnet und waren bei -80°C über Monate haltbar. Lysat-Proben wurden erhalten indem je nach Gelsystem 2, 3 bzw. 5 µl Standardprobe mit dem gleichen Volumen an Natriumphosphatpuffer pH 7,2 + 0,2% Triton X100 gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert wurden.

Im Fall von *S. mitis* wurde dem Natriumphosphatpuffer pH 7,2 + 0,2% Triton X100 0,5 mg/ml Cellosyl und 0,8 mg/ml Lysozym zugesetzt (Hakenbeck *et al.*, 1998). Die sonstige Behandlung der Proben entsprach der für *S. pneumoniae*.

Tab. 3.24: Natriumphosphatpuffer (pH 7,2; Gomori, 1955)

| Komponente                             | Menge |
|--|-------|
| 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 28 ml |
| 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 72 ml |

### 3.3.4 PBP-Markierung mit Bocillin FL

Penicillin-bindende Proteine lassen sich mit radioaktiven oder fluoreszierenden Penicillin-Derivaten durch eine kovalente Bindung markieren und mittels SDS-PAGE auftrennen. Niederaffine PBP-Varianten können hierbei schlechter bis fast gar nicht detektiert werden. Bocillin FL (Zhao *et al.*, 1999) hat gegenüber radioaktiven β-Lactamen den Vorteil, dass die Ergebnisse des Experiments binnen weniger Minuten vorliegen

Zur Markierung von PBPs in Zellysaten wurden dem Lyseansatz 1 µl 0,05 mM Bocillin zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

SDS-Gele mit Bocillin-markierten Proben wurden nach dem Lauf direkt mit dem Fluorlmager bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gescannt. Erst im Anschluss erfolgte eine Coomassie-Färbung zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels.



### 3.3.5 Western Blot

Der Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran durch ein Spannungsfeld wurde in der Grundidee 1979 publiziert (Renart *et al.*, 1979). Aber erst 1981, nach einigen methodischen Modifikationen, wurde dafür der Begriff „Western Blot“ in Anlehnung an die Transfermethoden für DNA („Southern Blot“, Southern, 1975) und RNA („Northern Blot“) geprägt (Burnette, 1981). Aufgrund der durch das SDS verursachten Ladung wandern die Proteine zur Anode und werden durch die Membran zurückgehalten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen (Hybond LPF PVDF Transfer Membrane, Amersham Biosciences) mittels zweier unterschiedlich großer Bio-Rad Tank-Blot-Systeme. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blot durch kurzes schwenken in Methanol aktiviert, mit Wasser gewaschen und abschließend in Transferpuffer äquilibriert.

Die Proteine im Gel wurden bei 150 mA für 1 h (kleines System) bzw. 350 mA für min. 4 h (großes System) bei ständiger Kühlung des Puffers auf die PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran herausgenommen und immunologisch analysiert. Das SDS-Gel wurde mittels Coomassie-Färbung auf einen eventuell unvollständigen Protein-Transfer untersucht.

Tab. 3.25: Transferpuffer für Western Blot

| Komponente       | Menge   |
|------------------|---------|
| Glycin           | 36,05 g |
| Tris             | 7,55 g  |
| H <sub>2</sub> O | ad 5 l  |

### 3.3.6 Immunologische Analyse von Western Blots

Schon in der ersten Publikation zum Western Blot wurden die transferierten Proteine mit spezifischen Antikörpern analysiert (Renart *et al.*, 1979). Diese bieten die Möglichkeit aus einer Menge von Proteinbanden im Optimalfall nur eine zu markieren.

Alle Stellen der Membran, die nach dem Blot noch nicht mit Proteinen besetzt waren, werden zunächst mit einer Milchpulver-Lösung geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Nach Zugabe der primären Antikörper binden diese an ihre spezifischen Epitope. Ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, bindet somit an den makroskopisch gleichen Stellen. Der 2. Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert, die dann eine lokale Färbungsreaktion katalysiert.

In den hier beschriebenen Experimenten erfolgte diese Analyse mit Antisera und affinitätsgereinigten Antikörpern, die von Kaninchen gegen verabreichte Proteine gebildet wurden. Zur Bindung der spezifischen und konjugierten Antikörper wurde die PVDF-Membran in den in Tab. 3.27 aufgeführten Lösungen geschwenkt.

Tab. 3.26: Immunfärbung von Western Blots

| Schritt               | Lösung*                               | Zeit               |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Blockieren            | PBS-Tween + 5% Milchpulver            | 2 h RT oder ÜN 4°C |
| Waschen               | PBS-Tween                             | 3 × 2 min RT       |
| primärer Antikörper   | Antiserum in PBS-Tween**              | 2 h RT oder ÜN 4°C |
| Waschen               | PBS-Tween                             | 3 × 2 min RT       |
| sekundärer Antikörper | Anti-rabbit IgG 1:30.000 in PBS-Tween | 2 h RT             |
| Waschen               | PBS-Tween                             | 3 × 2 min RT       |

\* Das Volumen der jeweiligen Lösung ist abhängig von der Größe der Membran und der Inkubationsschale.

\*\* Das jeweilige Antiserum / der jeweilige Antikörper und dessen Verdünnung sind im Ergebnisteil angegeben.

Vor der Färbung des Blots wurde dieser zuerst kurz in 37°C warmem Blotsubstratpuffer geschwenkt. Der Puffer wurde entfernt und durch ebenfalls vorgewärmte, frisch angesetzte Blotfärbelösung ersetzt. Diese enthält 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), ein artifizielles, chromogenes Substrat für die Alkalische Phosphatase. BCIP wird von dem Enzym zu Indoxyl und Phosphat hydrolysiert. Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) oxidiert Indoxyl zum blauen Indigo-Farbstoff. Dabei wird das Tetrazoliumsalz selbst reduziert und so zum ebenfalls blauen Formazan-Farbstoff.

Die Färbung erfolgte bei 37°C unter Ausschluss von Licht bei ständigem Schwenken. Das Ergebnis wurde alle 5-10 min kontrolliert, um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden. Spätestens nach 1 h wurde die Reaktion durch kurzes Waschen mit Wasser gestoppt, der Blot auf Whatmanpapier getrocknet, und anschließend mit dem Scanner die Ergebnisse dokumentiert.

Tab. 3.27: 20×PBS (phosphatgepufferte Saline)

| Komponente  | Menge  |
|---|--------|
| NaCl  | 160 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O | 28,8 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 4 g    |
| H <sub>2</sub> O                                      | ad 1 l |
| > autoklaviert und vor Gebrauch 1:20 verdünnt         |        |

Tab. 3.28: PBS-Tween

| Komponente           | Menge  |
|----------------------|--------|
| 20× PBS              | 50 ml  |
| Tween 20             | 1 ml   |
| H <sub>2</sub> O     | ad 1 l |
| > ÜN bei 4°C gerührt |        |

Tab. 3.29: Blotsubstratpuffer

| Komponente                   | Menge     |
|------------------------------|-----------|
| 1 M Tris                     | 50 ml     |
| 1 M NaCl                     | 50 ml     |
| 0,5 M MgCl <sub>2</sub>      | 5 ml      |
| H <sub>2</sub> O             | 200 ml    |
| > pH 9,5 mit HCl eingestellt |           |
| H <sub>2</sub> O             | ad 500 ml |

Tab. 3.30: Blotfärbelösung

| Komponente                            | Menge  |
|---------------------------------------|--------|
| Blotsubstratpuffer                    | 9 ml   |
| NBT (1 mg/ml in DMF)                  | 1 ml   |
| BCIP (5 mg/ml in DMF)                 | 100 µl |
| > direkt vor Versuchsbeginn angesetzt |        |

### 3.3.7 Überexpression von GST-Fusionsproteinen

Die Überexpression von Proteinen in Fusion mit der Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* ermöglicht es, diese in nur einem chromatografischen Schritt aufzureinigen (Smith und Johnson, 1988). Das lösliche Fusionsprotein bindet an ein spezielles Säulenmaterial (GSH-Sepharose), in welchem Glutathion kovalent an die Gelmatrix gekoppelt ist. Nach dem Waschen der Säule können die GST-Fusionsproteine mit reduziertem Glutathion eluiert werden oder, wie im Rahmen dieser Arbeit geschehen, mit PreScission Protease an der spezifischen Schnittstelle zwischen GST und gewünschtem Protein geschnitten werden. Der GST-tag und die Protease, die ebenfalls über einen GST-tag verfügt, bleiben auf der Säule zurück, während das synthetisierte Protein freigesetzt wird. Alle für diese Experimente benötigten Reagenzien (Vektor pGEX-6P-1, GSH-Sepharose, PreScission Protease) wurden als aufeinander abgestimmtes System bei GE-Healthcare bezogen.

Eine 1 l-Kultur von *E. coli* BL21 wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Induktion der Proteinüberexpression mit 0,5 mM IPTG (f.c.) wurde die Kultur über Nacht bei 15°C (PBP2x) bzw. 22°C (PBP2a) weiter geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 10.000 rpm mit dem JA10-Rotor in der J2-21 Zentrifuge bei 4°C geerntet, dann mit PBSKMT gewaschen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment wurde in 35 ml PBSKMT resuspendiert und in 50 ml-Falconröhrchen überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Suspension wurde 4 mal für 1 min mit dem Ultraschall-Desintegrator bei Stufe 7 behandelt. Die vollständige Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert. Die lösliche und unlösliche Fraktion wurden für 1 h bei 8.000 rpm in der Biofuge getrennt.

Durch Vorversuche hatte sich herausgestellt, dass die PBP2a-Fusionsproteine, im Gegensatz zum PBP2x-Derivat, fast ausschließlich in unlöslicher Form vorliegen.

Daher wurden die im unlöslichen Teil (Sediment) befindlichen Proteine in 15 ml TKC-Puffer solubilisiert. Dieser enthält 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), ein zwitterionisches Detergenz. Das nach 15 min bei 15.000 rpm im Sorvall SS34-Rotor erhaltene Sediment wurde nochmals solubilisiert und die beiden Überstände vereinigt. Für das lösliche PBP2x-Derivat entfiel der Solubilisierungsschritt.

2 ml GSH-Sepharose-Suspension (entspricht ca. 1 ml GSH-Sepharose) wurden 2 mal mit TKC (PBP2a) bzw. PBSKMT (PBP2x) gewaschen und anschließend mit den Überständen aus der Lyse bzw. Solubilisierung in einem 50 ml-Falconröhrchen gemischt. Der Ansatz wurde mit TKC bzw. PBSKMT auf 40 ml aufgefüllt und 2 h auf dem Rollbrett inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Chromatographie-Säule gegeben und die flüssige Phase abgelassen. Anschließend wurde das Säulenmaterial laut Tab. 3.32 gewaschen.

Tab. 3.31: Waschschrirte bei der GSH-Affinitätschromatographie

|   | PBP2a-Derivate               | PBP2x-Derivat   |
|---|------------------------------|-----------------|
| 1 | 20 ml TKC                    | 20 ml PBSKMT    |
| 2 | 20 ml TKC                    | 20 ml PBSKMT    |
| 3 | 20 ml CL-Puffer + 0,5% CHAPS | 20 ml PBSKM     |
| 4 | -                            | 20 ml CL-Puffer |

Die Säule wurde auf 5 ml mit CL-Puffer (+/-CHAPS) aufgefüllt und mit 80 U PreScission Protease versetzt. Die Säule wurde zur Spaltung verschlossen und über Nacht auf dem Rollbrett inkubiert. Am nächsten Tag wurde die flüssige Phase abgelassen (= Elution 1) und mit 3 × 1 ml CL-Puffer (+/-CHAPS) gewaschen (= Elution 2-4). Bei den einzelnen Schritten wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Tab. 3.32: PBSKM und PBSKMT

| Komponente   | Menge  |
|--|--------|
| 20×  | 50 ml  |
| 1 M KCl  | 3 ml   |
| 1 M MgCl <sub>2</sub>  | 1 ml   |
| H <sub>2</sub> O   | ad 1 l |
| > für PBSKMT wurden 1 ml Tween 20 zugesetzt und ÜN bei 4°C gerührt |        |

Tab. 3.33: TKC-Puffer

| Komponente       | Menge     |
|------------------|-----------|
| 1 M Tris pH 8    | 10 ml     |
| 1 M KCl          | 40 ml     |
| Chaps            | 1 g       |
| H <sub>2</sub> O | ad 200 ml |

Tab. 3.34: CL-Puffer

| Komponente                   | Menge     |
|------------------------------|-----------|
| Tris                         | 21,1 g    |
| NaCl                         | 17,5 g    |
| 0,5 M EDTA                   | 4 ml      |
| H <sub>2</sub> O             | 130 ml    |
| > pH 7 eingestellt           |           |
| H <sub>2</sub> O             | ad 198 ml |
| > autoklaviert               |           |
| 1 M DTT                      | 2 ml      |
| > vor Gebrauch 1:10 verdünnt |           |

### 3.3.8 Quantifizierung von Proteinen

Das Methodenspektrum zur Quantifizierung von Proteinen ist sehr breit. Es umfasst sowohl chemische als auch physikalische Ansätze, die bezogen auf die jeweilige Anwendung ihre Stärken und Schwächen haben. Im Rahmen dieser Arbeit kamen Proteinbestimmung über UV-Extinktion und die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) zum Einsatz.

Die Bradford-Untersuchung ist ein Farbttest, der darauf beruht, dass der Farbstoff Coomassie mit den kationischen und den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe bildet. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoff liegt bei 470 nm und verschiebt sich bei der Komplexbildung auf 595 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bradford-Test mit der entsprechenden Lösung von BioRad nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Gereinigte Proteine in klaren Lösungen wurden über ihre UV-Extinktion bei  $OD_{280}$  direkt bestimmt (Layne, 1957). Bei dieser Wellenlänge haben die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan ihr Absorptionsmaximum. Über die Aminosäuresequenz des Proteins wurde mit der Software Protean (DNA-Star, Madison (USA)) ein direkter Umrechnungsfaktor für jedes Protein bestimmt. Mit dem Mikrophotometer gemessene Werte wurden so von  $OD_{280}$  auf Proteinkonzentration umgerechnet. Zusätzlich wurde durch Analyse des Absorptionsspektrum ausgeschlossen, dass Nukleotide oder Nukleinsäuren (Absorptionsmaximum bei 260 nm) die Messung beeinflussten.

### 3.3.9 Gelfiltration

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Die hierfür verwendeten PD-10 Säulen wurden zu Beginn des Versuches mit 25 ml des Endpuffers equilibriert. Anschließend wurde die im Ausgangspuffer gelöste Proteinprobe sofern nötig mit Endpuffer auf 2,5 ml aufstockt. Mit dieser Lösung wurde die Säule beladen. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml Endpuffer in 500  $\mu$ l-Fractionen. Die Fractionen wurden auf ihren Proteingehalt untersucht und grafisch in Relation zum Elutionsvolumen gesetzt. Die Proben mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt und für weitere Versuche verwendet.

### 3.3.10 Herstellung von Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Kaninchen-Antiseren gegen PBP2a wurden bei der Firma Seqlab (Göttingen) hergestellt. Hierzu wurden 1250mg zweier PBP2a-Derivate in gefällter Form verschickt.

Hierzu wurde die Proteinlösung in mehrere Aliquots geteilt und mit dem jeweils 4-fachen Volumen an -20°C kaltem Aceton gemischt. Nach der Fällung bei -20°C über Nacht wurden die Proben bei 13.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Sedimente bei 30 min RT in der SpeedVac getrocknet. Zur Mengenbestimmung wurde je ein Aliquot mit einem ml SDS-Probenpuffer pro eingesetztem µg Protein aufgekocht und mittels SDS-Page mit definierten Mengen BSA verglichen.

Die so überprüften Proben wurden bei Seqlab im Standard-Immunisierungsschema (3 Monate, Tab. 3.35) eingesetzt. Präimmunseren sowie die 1. und 2. Blutentnahme wurden in Western-Blot-Experimenten verglichen.

Tab. 3.35: Standard-Immunisierungsschema der Firma Seqlab

| Tag | Protokollschritt | entnommenes Serum   |
|-----|------------------|---------------------|
| 0   | 1. Injektion     | >5 ml Präimmunserum |
| 21  | 2. Injektion     | -                   |
| 35  | 1. Blutentnahme  | 10-20 ml            |
| 49  | 3. Injektion     | -                   |
| 63  | 2. Blutentnahme  | 2ml + 10-20 ml      |
| 77  | 4. Injektion     | -                   |
| 98  | Endblutung       |                     |

### 3.3.11 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Antiseren bestehen neben einer Reihe von anderen Komponenten aus einem Gemisch von Antikörpern, wobei der Anteil der gegen das gewünschte Antigen gerichteten Antikörper je nach Qualität des Serums unterschiedlich hoch sein kann. Um nun die spezifischen Antikörper aus dem Gemisch zu extrahieren, immobilisiert man das Protein, gegen den der gewünschte Antikörper gerichtet ist, an einer Säule und gibt das Antiserum dazu. Die spezifischen Antikörper werden gebunden, während alle unspezifischen passieren.

Nach dem Waschen der Säule, werden die verbleibenden Antikörper mit saurem Glycin teilweise denaturiert und so von der Säule getrennt. Bei sofortigem pH-Ausgleich renaturieren die Antikörper und liegen anschließend in einem hohem Reinheitsgrad und einer hohen Konzentration vor.

Ca. 3 mg des gereinigten Proteins wurden mittels Gelfiltration in Kopplungspuffer gelöst. Die Proteinlösung wurde auf 5 ml aufgefüllt und dreimal bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 Tropfen/s über eine mit 3 × 2 ml 1 mM HCl gewaschene 1 ml HiTrap NHS Säule gegeben. Die so beladene Säule wurde nach dem in Tab. 36 angegebenen Verfahren gewaschen und ihre Protein-Bindungsfähigkeit inaktiviert.

Tab. 3.36: Waschen, Deaktivieren und Neutralisieren der HiTrap NHS Säule

|                           | Lösung                             | Menge    |
|---------------------------|------------------------------------|----------|
| 1                         | Puffer A                           | 3 × 2 ml |
| 2                         | Puffer B                           | 3 × 2 ml |
| 3                         | Puffer A                           | 3 × 2 ml |
| > 30 min bei RT inkubiert |                                    |          |
| 4                         | Puffer B                           | 3 × 2 ml |
| 5                         | Puffer A                           | 3 × 2 ml |
| 6                         | Puffer B                           | 3 × 2 ml |
| 7                         | 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 | 3 ml     |

Anschließend wurden 20 ml Antiserum mit dem gleichen Volumen 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 (+ 10 mM EDTA) gemischt. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde dieses Gemisch für 30 min bei 8.000 rpm und 4°C in der Heraeus Biofuge zentrifugiert und der Überstand durch einen Sterilfilter mit 5 µm Porengröße filtriert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte im Kühlraum durchgeführt.

Das verdünnte Antiserum wurde über Nacht mit der Peristaltikpumpe im Zirkulationsverfahren bei einer Flussgeschwindigkeit von einem Tropfen/3 s über die Säule gegeben, auf der das Antigen immobilisiert war. Diese wurde anschließend bei gleichem Durchfluss mit 40 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit dreimal 5 ml 100 mM Glycin pH 2,2 in je 365 ml vorgelegten 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8). Vor und nach jedem Schritt wurden Proben des Antiserums genommen und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.



Tab. 3.37: Kopplungs-Puffer

| Komponente           | Menge     |
|----------------------|-----------|
| NaHCO <sub>3</sub>   | 1,68 g    |
| NaCl                 | 2,92 g    |
| H <sub>2</sub> O     | 80 ml     |
| > pH 8,3 eingestellt |           |
| H <sub>2</sub> O     | ad 100 ml |

Tab. 3.38: Puffer A

| Komponente           | Menge     |
|----------------------|-----------|
| Ethanolamin          | 3,05 g    |
| NaCl                 | 2,92 g    |
| H <sub>2</sub> O     | 80 ml     |
| > pH 8,3 eingestellt |           |
| H <sub>2</sub> O     | ad 100 ml |

Tab. 3.39: Puffer B

| Komponente         | Menge     |
|--------------------|-----------|
| Natriumacetat      | 0,82 g    |
| NaCl               | 2,92 g    |
| H <sub>2</sub> O   | 80 ml     |
| > pH 4 eingestellt |           |
| H <sub>2</sub> O   | ad 100 ml |

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Deletion von *pbp2a* und Cefotaxim-Resistenz

In Cefotaxim-selektierten Labormutanten (Laible und Hakenbeck, 1987) treten in drei voneinander unabhängigen Linien Mutationen in *pbp2a* auf, die zum vorzeitigen Translationsstopp und somit zur Inaktivierung der Transpeptidaseaktivität von PBP2a führen (van der Linden, unveröffentlichte Daten). Der Verlust eines PBP als Resistenzmarker ist ein bisher noch nicht beobachtetes Phänomen. Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wurden Mutanten mit inaktivierten PBP2a dargestellt und hinsichtlich ihrer Cefotaximresistenz überprüft. Das *pbp2a*-Allel der Mutante C403 wurde stellvertretend ausgewählt. In dieser Mutantenfamilie tritt in der ersten Mutante C103 eine Mutation in *ciaH* auf, gefolgt von PBP2x Mutationen in C203 und C303. In C403 wird der PBP2a-minus Phänotyp beobachtet, d.h. PBP2a kann als PBP-β-Lactam-Komplex nicht nachgewiesen werden (Laible *et al.*, 1987; siehe Tabelle 4.1). Diese Mutantenfamilie ist gut untersucht (Mascher *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 2008). Relevante Ergebnisse werden an entsprechender Stelle im Text erwähnt.

Tab. 4.1: Mutationen in der mit Cefotaxim selektierten *S. pneumoniae*-Mutantenfamilie C003 ( Laible *et al.*, 1987; van der Linden, unveröffentlichte Daten)

| Mutante | mutiertes Gen | Mutation                                    |
|---------|---------------|---|
| R6      | -             | -   |
| C103    | <i>ciaH</i>   | A <sub>203</sub> >V                         |
| C201    | <i>pbp2x</i>  | G <sub>597</sub> >D                         |
| C303    | <i>pbp2x</i>  | T <sub>550</sub> >A                         |
| C403    | <i>pbp2a</i>  | 8bp-repeat C <sub>84</sub> -C <sub>91</sub> |
| C503    | <i>pbp2x</i>  | R <sub>426</sub> >C                         |

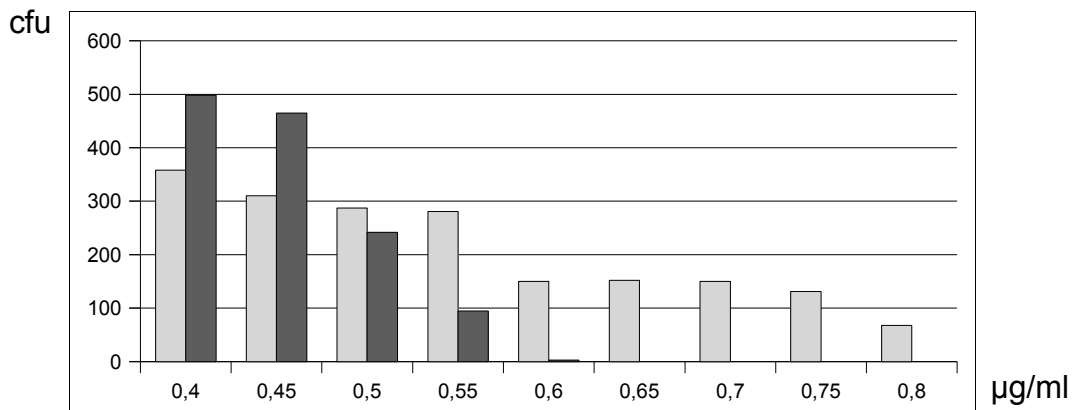
#### 4.1.1 Transformation von C303 mit *pbp2a*<sub>C403</sub> mit Cefotaxim-Selektion

Bisherige Versuche, *pbp2a* in der Mutante C303 zu inaktivieren, hatten unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Eine Unterbrechung des Gens durch Insertions-Duplikations-Mutagenese (IDM) führte nur zu einem marginalen Anstieg in der Resistenz, während nach Transformation von C303 mit chromosomaler DNA von C403 Transformanten mit wesentlicher höherer Resistenz erhalten wurden (Rutschmann, 2003). In beiden Fällen konnte PBP2a nicht mehr in  $\beta$ -Lactam Bindungsversuchen nachgewiesen werden. Der wesentliche Unterschied dieser Versuche besteht in der Selektionsmethode. Bei der Unterbrechung eines Gens mit Hilfe von pJDC9-Derivaten wird mit Erythromycin selektioniert. Im zweiten Fall wird die Cefotaxim-Selektion verwendet, wodurch auch Mutationen in *ciaH* auftreten können (AG Hakenbeck, unveröffentlichte Daten).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass mehr als eine Mutation zur Resistenzhöhung in C403 beiträgt.

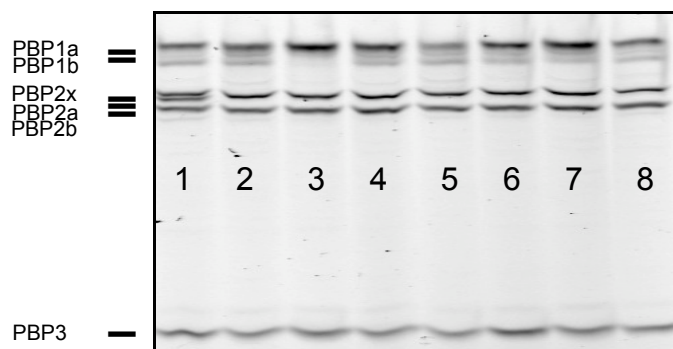
Im Folgenden sollte der Einfluss der PBP2a<sub>C403</sub>-Mutation geklärt werden, in dem unterschiedliche methodische Ansätze verwendet wurden, um *pbp2a*<sub>C403</sub> in den Stamm C303 einzubringen. Dafür wurde ein PCR Produkt verwendet, das die *pbp2a*-Mutation von C403 überdeckt und >1 kb flankierende Regionen enthält. Dieses Fragment wurde direkt in Transformationsversuche mit C303 als Rezipient eingesetzt, und die Selektion erfolgte mit Cefotaxim. Weiterhin wurde das *pbp2a*<sub>C403</sub> mittels der Janus-Kassette in C303 transformiert. Dies ermöglicht eine Cefotaxim-unabhängige Selektion auf den Austausch des gewünschten Allels. Ein mittels IDM erhaltene Transformante (*S. pneumoniae* C303<sub>*pbp2a::pJDC9*</sub>; Rutschmann, 2003) wurde zum Vergleich mitgeführt.

Für den ersten Ansatz wurde ein 3,4 kb großes PCR-Produkt aus C403 amplifiziert (Primer 2aDOWN vs. 2a2268r), aufgereinigt und in C303 transformiert. Die Selektion erfolgte auf mehreren Blutagarplatten mit steigenden Cefotaxim-Konzentrationen (siehe Abb. 4.1). Als Kontrolle wurde ein Transformationsansatz ohne Donor-DNA auf Platten mit den gleichen Mengen Antibiotikum ausplattiert.



**Abb. 4.1:** Transformation von *pbp2a*<sub>C403</sub> in C303: Anzahl der Kolonien [cfu] auf steigenden Cefotaxim-Konzentrationen [µg/ml]; Transformationsansatz mit Donor-DNA (hellgrau) und Kontroll-Ansatz ohne Donor DNA (dunkelgrau);

Von der Platte mit 0,6 µg/ml Cefotaxim wurden 7 Transformanten ausgewählt, da hier bei der Kontrolle lediglich drei Kolonien zu sehen waren. Die Transformanten wurden durch PBP-Bindungsstudien überprüft. Die Ergebnisse der Fluorlmageranalyse sind in Abb. 4.2 zu sehen.



**Abb. 4.2:** PBP-Profile von Transformanten der Mutante C303 mit *pbp2a*<sub>C403</sub>. Zellysate der Transformanten wurden mit Bocillin inkubiert, und die PBP Profile nach SDS-PAGE mit Hilfe des Fluorlmagers dargestellt. *pbp2a*<sub>C403</sub>-Transformanten von C303 (Transformanten C1-7 auf den Spuren 2-8); C303 (Spur 1); Die Lage der PBPs ist auf der linken Seite schematisch dargestellt.

Bei den Transformanten C3 und C4 wurde die DNA-Sequenz von *pbp2a* überprüft. In beiden Fällen war das Allel von C403 vorhanden (Abb. 4.3).

|                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| Transformant C3 | TACTATCTTACGTCCTTACGTCGCTCTC |
| Transformant C4 | TACTATCTTACGTCCTTACGTCGCTCTC |
| S.p. R6 wt      | TACTAT-----CTTACGTCGCTCTC    |

Abb. 4.3: Vergleich der DNA-Sequenz der Cefotaxim-selektionierten C303<sub>pbp2aC403</sub>-Transformanten C3 und C4 mit der Wildtyp-Sequenz von S.p. R6. Der gezeigte Ausschnitt beginnt bei T<sub>78</sub>.

#### 4.1.2 CiaH-Mutationen und Cefotaximselektion

Cefotaxim ermöglicht nicht nur Selektion auf Mutationen in PBP2a, wie z.B. in der Mutanten C303. Ebenso können Spontanmutationen in anderen Resistenzdeterminanten selektioniert werden. Die bekannten Mutationen der C-Mutanten (Tab. 1.1) zeigen, dass solche in *pbp2x* und *ciaH* häufig auftreten, und auch alleine zu einer selektionierbaren Resistenzhöhung führen (Laible und Hakenbeck, 1987; Guenzi *et al.*, 1994). PBP2x zeigte in PBP-Bindungsstudien bei keiner der C303<sub>pbp2aC403</sub>-Transformanten eine deutliche Veränderung in der Bocillin-Affinität, daher wurde hier die Anwesenheit einer zusätzlichen Mutation in *pbp2x* nicht verfolgt. Die Überprüfung der *ciaH*-Allele der Transformanten C3 (MHK<sub>CTX</sub> = 0,55µg/ml) und C4 (MHK<sub>CTX</sub> = 0,9µg/ml) ergab, dass bei C4 in *ciaH* das Thymin an Position 229 gegen ein Guanin ausgetauscht wurde, was bei der Translation zu einem vorzeitigen Stop-Codon an Position 77 führt.

Darüber hinaus wurde das *pbp2a*<sub>C403</sub> Allel in zwei weitere Stämme transformiert, die resistente PBP2x-Gene aus klinischen Isolaten, also hochvariable Mosaikgene, enthielten. Diese waren isoliert worden, um zu sehen, ob eine Deletion von PBP2a in diesen Fällen ebenfalls zur Resistenz führen kann, oder ob dieses Phänomen nur beobachtet wird, wenn PBP2x einzelne Punktmutationen enthält. Auch diese Stämme wurden auf Mutationen in *ciaH* überprüft.

Tab. 4.2: *ciaH*-Mutationen in Cefotaxim-Selektionierten *pbp2a*-Transformanten

| Parentalstamm                                      | transformiertes <i>pbp2a</i> -Allel | <i>ciaH</i> -Mutation | CiaH-Mutation         |
|--|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x 2349</sub> (A5) | C403                                | A <sub>721</sub> >C   | T <sub>241</sub> >P   |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x 2349</sub> (A5) | C403                                | C <sub>287</sub> >G   | T <sub>96</sub> >A    |
| <i>S. pneumoniae</i> R6 <sub>pbp2x U11</sub> (B3)  | C403                                | G <sub>1078</sub> >T  | D <sub>360</sub> >T   |
| <i>S. pneumoniae</i> C303 (C4)                     | C403                                | G <sub>229</sub> >T   | E <sub>77</sub> >STOP |

In drei von acht getesteten Stämmen wurden insgesamt vier zusätzliche Mutationen in *ciaH* gefunden, die auch auf Protein-Ebene Auswirkungen hatten (Tab 4.2). Keine der hierbei entdeckten Mutationen war in Cefotaxim-resistenten Mutanten bisher beschrieben. Somit ist die Gefahr unerwünschter Mutationen in *ciaH* bei Cefotaximselektion sehr hoch. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass auch in nicht überprüften Genen oder bisher nicht mit Cefotaxim-Resistenz assoziierten Loci Veränderungen auftreten könnten.

Daher wurden alle folgenden Transformationen von *pbp2a*-Allelen mit Hilfe der Januskassette durchgeführt. Auch die Transformationen von *pbp2a*<sub>C403</sub> wurden auf diese Weise wiederholt und bereits erhaltene Transformanten nicht weiter untersucht.

#### 4.1.3 Transformation von C303 mit *pbp2a*<sub>C403</sub> ohne Cefotaxim-Selektion

Die Januskassette ist ein Konstrukt, das einen Kanamycin-Resistenzmarker und den dominanten Streptomycin-Sensitivitätsmarker *rpsL*<sup>+</sup> enthält (Sung *et al.*, 2001). Der Einsatz dieser Kassette ermöglicht den Austausch des *pbp2a*-Allels ohne Selektionsdruck durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und das damit verknüpfte Risiko zusätzlicher Mutationen. Dies wird durch 3 Transformationsschritte erreicht:

- Einbringung von Streptomycinresistenz in den Ausgangsstamm durch Transformation mit chromosomaler AmiA9-DNA und Selektion mit Streptomycin.
- Konstruktion einer Januskassette mit flankierenden *pbp2a*-Teilen durch überlappende PCR und anschließende Transformation des *str*<sup>r</sup>-Stammes mit dieser *pbp2a*-Januskassette unter Selektion mit Kanamycin.
- Transformation des nun *kan*<sup>r</sup>- und *str*<sup>s</sup>- Stammes mit dem gewünschten *pbp2a*-Allel unter Selektion auf Streptomycin.

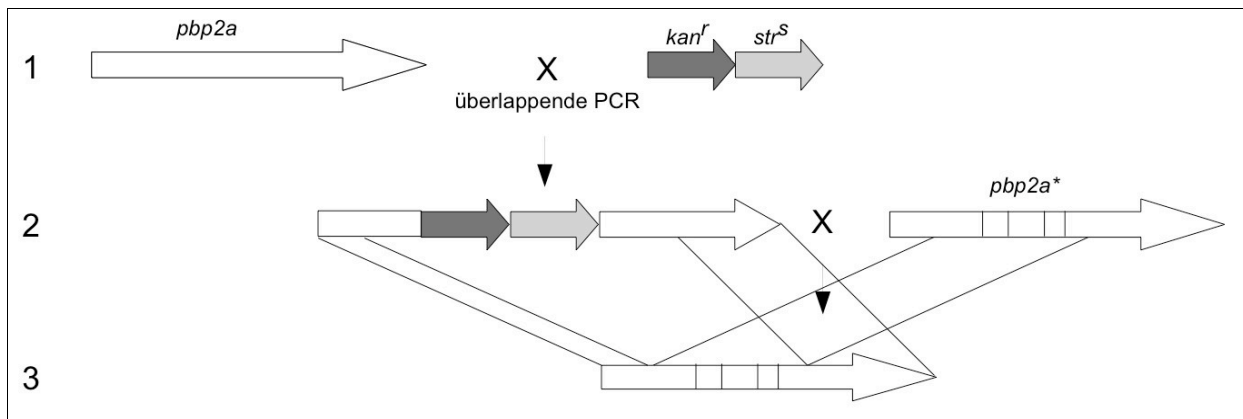


Abb. 4.4: Einsatz der Januskassette zur Mutation von *pbp2a*. Die Januskassette (dunkelgrau = *kan<sup>r</sup>*-Marker; hellgrau = *str<sup>S</sup>*-Marker) wird mittels überlappender PCR (1) in das Wildtyp-*pbp2a* eingefügt. Das gewünschte *pbp2a*-Allel (*pbp2a\**; 2) wird mittels Transformation und Selektion auf *str<sup>r</sup>* gegen die Janus-Kassette ausgetauscht. Abschnitte des gewünschten Allels werden ins Genom integriert (3). Mutationen in *pbp2a\** sind schwarz angedeutet.

Mit Hilfe dieser Methode wurde das *pbp2a*-Allel von C403 in C303 transformiert. Sieben Transformanten wurden ausgewählt und in PBP-Bindungsstudien überprüft. Bei zwei der überprüften Transformanten konnte PBP2a nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Die zugehörigen *pbp2a*-Allele wurden sequenziert. In beiden Fällen war der 8bp-repeat des C403-Allels vorhanden. Transformanten, bei denen PBP2a nachweisbar war, wurden nicht weiter untersucht, da hier die Rekombination ohne Übertragung der Mutation stattfand.

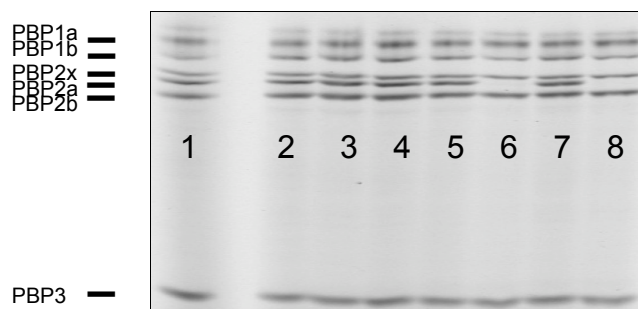
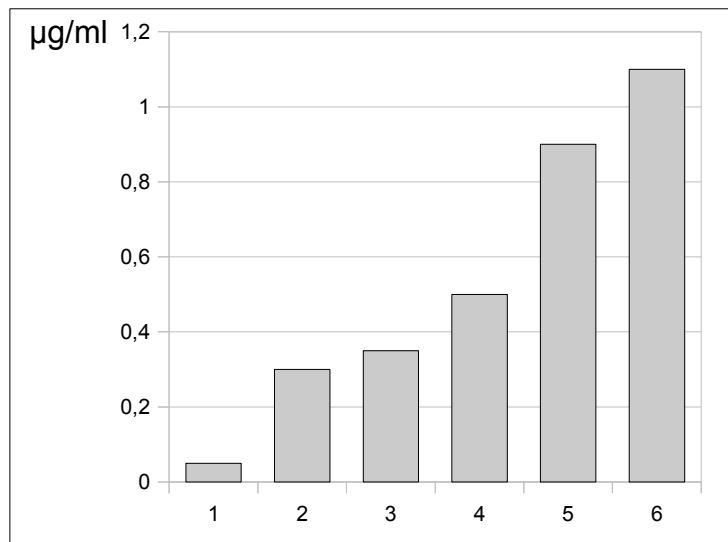


Abb. 4.5: PBP-Profile selektionierter Janus-*pbp2a*<sub>C403</sub>-Transformanten von C303 (Transformanten 1-7 auf den Spuren 2-8); R6-Lysat als Kontrolle (Spur 1); Die Lage der PBPs ist auf der linken Seite schematisch dargestellt.



**Abb. 4.6:** MHK von *pbp2a*<sub>C403</sub>-Transformanten und Referenzstämmen gegen Cefotaxim: 1 = *S. p.* R6; 2 = *S. p.* C303; 3 = *S. p.* C303<sub>*pbp2a*C403</sub> (Janus); 4 = *S. p.* C303<sub>*pbp2a*::pJDC9</sub>; 5 = *S. p.* C303<sub>*pbp2a*C403 *ciaH* E77>STOP</sub> (Cefotaxim-Selektion; Transformante C4); 6 = *S. p.* C403. Die Bestimmung erfolgte in Konzentrationsschritten von 0,05 µg/ml.

Eine Unterbrechung des Gens mittels IDM lieferte Transformanten mit einer um 0,2 µg/ml erhöhten Cefotaxim-Resistenz. Mittels Cefotaxim-Selektion erhaltene *pbp2a*<sub>C403</sub>-Transformanten zeigen zwar eine höhere Cefotaxim-Resistenz, jedoch werden neben dem transformierten Allel zum Teil auch weitere Mutationen selektioniert, so dass der Effekt des angestrebte Austausch des *pbp2a*-Allels nicht bewertet werden kann.

Die Transformanten von C303, bei denen das *pbp2a*-Allel von C403 mit Hilfe der Janus-Kassette eingefügt wurde, weisen eine im Vergleich zum Parentalstamm C303 erhöhte MHK auf. Jedoch beträgt der Unterschied lediglich 0,05 µg/ml.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Selektionsmethoden zeigen, dass zusätzliche Mutationen in anderen Genen hier zu sehen am *Beispiel* von *S. p.* C303<sub>*pbp2a*C403 *ciaH* E77>STOP</sub> (Transformante C4), einen Einfluß auf die Resistenz haben können. Da sich diese unerwünschten Mutationen nicht notwendigerweise auf die überprüften Loci beschränken, wurde für künftige *pbp2a*-Transformationen ausschließlich die Janus-Kassette verwendet.

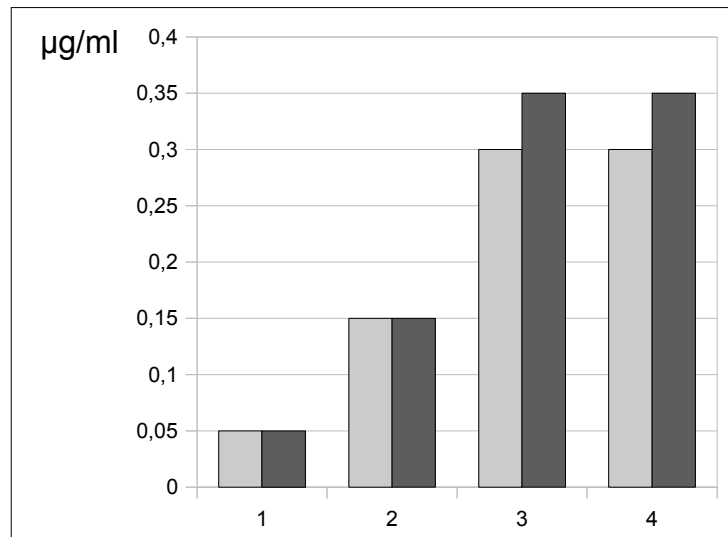
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Inaktivierung von *pbp2a* in C303 zu einer Erhöhung der Cefotaxim-MHK führt. Allerdings wird mit keiner der verwendeten Selektionsmethoden durch Inaktivierung von PBP2a in C303 das Resistenzniveau von C403 erreicht.



#### 4.1.4 Deletion von PBP2a in PBP2x-Mutanten

Wie bereits unter 1.6 beschrieben zeichnet sich C303 als Ausgangsstamm für PBP2a-Transformationsexperimente nicht nur durch Mutationen in PBP2x, sondern auch durch eine Mutation in *ciaH* aus. Auch bei den beiden anderen C-Mutanten in denen PBP2a-Mutationen auftraten (C406 und C604) waren in vorhergehenden Selektionsschritten *ciaH*-Mutationen aufgetreten (Tab 1.1). Dieser Zusammenhang wirft die Frage auf, ob die Kombination von PBP2x- und *CiaH*-Mutationen notwendig ist, um einen Effekt der PBP2a-Deletion auf die Cefotaxim-Resistenz ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden zwei Stämme ausgewählt, die sich nur bezüglich PBP2x vom Wildtyp R6 unterscheiden und mit dem *pbp2a*-Allel von C403 transformiert. Ein Stamm besaß eine Punktmutation in PBP2x (T550>A). Diese Mutation tritt in der Labormutante C303 auf und verursacht eine erniedrigte  $\beta$ -Lactam-Affinität sowie eine erhöhte Cefotaxim-Resistenz (Coffey *et al.*, 1995). Weiterhin wurde für dieses Experiment ein *pbp2x* mit einem Mosaik-Block aus dem klinischen Isolat 2349 des Serotyps 23F gewählt. Auch bei diesem Stamm ist die  $\beta$ -Lactam-Affinität von PBP2x erniedrigt und die Cefotaxim-Resistenz erhöht (Reichmann *et al.*, 1997).

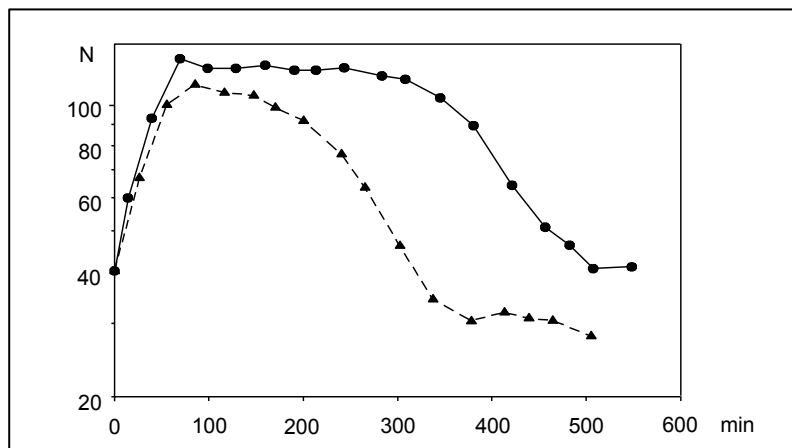
Bei beiden Stämmen, und zum Vergleich auch bei *S. pneumoniae* R6, wurde mittels der Januskassette das *pbp2a*-Allel von C403 eingefügt und somit PBP2a inaktiviert. Die PBP-Profile ausgewählter Transformanten wurden in Bocillin-Bindungsstudien ermittelt und so PBP2a-defiziente Stämme identifiziert. Bei R6 war in einem von 10 Transformanten, bei R6<sub>PBP2x T550>A</sub> in einem von 5 und bei R6<sub>pbp2x2349</sub> in einem von 8 die Bande für PBP2a nicht mehr markierbar, alle diese Stämme wiesen das C403-Allel auf. Bei den so überprüften Transformaten und deren Ausgangsstämmen wurde die Cefotaxim-MHK bestimmt.



**Abb. 4.7:** MHK der Janus-*pbp2a*<sub>C403</sub>-Transformanten (dunkelgrau) von *S. p.* R6 (1), *S. p.* R6<sub>*pbp2x* T550>A</sub> (2) und *S. p.* R6<sub>*pbp2x* 2349</sub> (3) und ihrer Ausgangsstämme (hellgrau). *S. p.* C303 (4) wurden zum Vergleich mitgeführt. Die Bestimmung erfolgte in Konzentrationsschritten von 0,05 µg/ml in 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils doppeltem Ansatz. Die hier dargestellten Werte stammen aus einem Experiment; Daten aus anderen Bestimmungen weichen hiervon nicht ab.

Die Transformation des *pbp2a*-Allels von *S. p.* C403 in *S. p.* R6 führte zu keiner Erhöhung der MHK gegen Cefotaxim. Der Verlust von PBP2a stellt demnach, wie erwartet, keine primäre Resistenzdeterminante dar. Dies konnte für pJDC9::*pbp2a*-Derivate bereits gezeigt werden (Paik *et al.*, 1999). Auch in Kombination mit der Mutation von T<sub>550</sub>>A in der primären Resistenzdeterminante PBP2x (Laible and Hakenbeck, 1991; Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Sifaoui *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 2008), führt der Verlust von PBP2a zu keinem zusätzlichen Effekt innerhalb des Konzentrationsbereichs von +/- 0,05µg/ml. Lediglich in C303 und R6<sub>*pbp2x*2349</sub> konnte eine leichte Erhöhung der MHK verzeichnet werden. Somit zeigt sich ein Unterschied zwischen Stämmen mit PBP2x aus Labormutanten und solchen mit PBP2x aus klinischen Isolaten. Während Punktmutationen in PBP2x in Kombination mit dem *pbp2a*-Allel von C403 zu keinem zusätzlichen Effekt auf die Resistenz führen, verursacht die Kombination von PBP2x-Punktmutationen, und CiaH-Mutationen mit Deletion von PBP2a (C303<sub>*pbp2a*C403</sub>) in Labormutanten eine leichte Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz. Die Kombination von klinischem PBP2x und dem *pbp2a*-Allel von C403 hingegen erzeugt auch ohne CiaH-Mutation eine leichte Resistenzerhöhung.

Der Effekt des Verlusts von PBP2a auf Wachstum und Lyse wurde in *S. p.* R6 und *S. p.* R6<sub>pbp2a C403</sub>, d.h. ohne Mutationen in anderen Genen, analysiert (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** Wachstum und Lyse von *S. pneumoniae* mit und ohne PBP2a. Eine Vorkultur von *S. p.* R6 (●) und *S. p.* R6<sub>pbp2a C403</sub> (▲) wurde in vorgewärmtes C-Medium 1:50 verdünnt, und das Wachstum zu den angegebenen Zeiten mit dem Nephelometer gemessen.

Im Vergleich zu R6 weist d *S.p.* R6<sub>pbp2a C403</sub> eine längere Generationszeit auf. Während *S. p.* R6 eine Generationszeit von 27 min aufweist, beträgt diese in *S. p.* R6<sub>pbp2a C403</sub> 40 min. Im weiteren Verlauf erreicht *S. p.* R6<sub>pbp2a C403</sub> nicht die Zelldichte von *S. p.* R6 und lysiert direkt nach Erreichen des Maximums ohne eine stationäre Phase zu durchlaufen Dieser Effekt wurde in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Lyse verläuft mit derselben Rate wie bei *S. p.* R6. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Experimente, die mit pJDC9-Derivaten erhalten wurden (Paik *et al.*, 1999) und zeigen, dass diese nicht durch das dort verwendete Selektions-Antibiotikum Erythromycin bedingt waren.

Die Versuche belegen, dass die Deletion von PBP2a zu einer Erhöhung der Resistenz gegen Cefotaxim führt, allerdings nur in Anwesenheit eines nieder-affinen PBP2x. Die Höhe der Resistenz wird durch das *pbp2x*-Allel beeinflusst. Eine Deletion von PBP2a in dem Wildtyp führt dabei zu einer vorzeitigen Lyse, die nach Erreichen der höchsten Zelldichte sofort einsetzt.

## 4.2 PBP2a in Penicillin-resistenten klinischen Streptokokkenisolaten

Neben der unter 1.4 beschriebenen Situation bei Labormutanten spielt PBP2a auch eine Rolle bei der Entwicklung von  $\beta$ -Lactam-Resistenz in klinischen Isolaten. In diesem Umfeld wurde jedoch kein Verlust, sondern, wie von anderen PBPs bereits bekannt, niederaffine Varianten von PBP2a beschrieben.

Erste Anzeichen, dass PBP2a-Veränderungen auch in klinischen Isolaten mit Resistenz assoziiert sind, wurden Ende der 90er Jahre beschrieben. Bei Transformation mit chromosomaler DNA klinischer Isolate unter Cefotaxim-Selektion wurden *pbp2a* Allele, die offenbar für niederaffine PBP2a-Varianten kodieren, übertragen (Reichmann *et al.*, 1996; Reichmann *et al.*, 1997). Der Einfluss von PBP2a auf die Resistenz ist jedoch abhängig vom genetischen Hintergrund des Akzeptors (Hakenbeck *et al.*, 1998). Die Transformation von *pbp2a*-Varianten, die für niederaffine Enzyme codieren, kann in klinischen Isolaten zur Erhöhung der Resistenz gegen Penicillin und Cefotaxim führen (Smith *et al.*, 2005).

Die Rolle eines niederaffinen PBP2a bei der Resistenzentwicklung klinischer Isolate und die dazu nötigen genetischen Voraussetzungen wurden in den nachfolgend beschriebenen Experimenten untersucht. Des Weiteren wurden Mutationen charakterisiert, die mit der *pbp2a*-vermittelten Resistenz assoziiert sind.

### 4.2.1 PBP2a-Allele in klinischen Streptokokkenisolaten

Im Rahmen internationaler Kooperation mit Kollegen aus Rumänien und Polen wurden in der Arbeitsgruppe von R. Hakenbeck hochresistente *S. p.*-Stämme aus diesen Ländern u.a. mit PBP-Bindungsstudien untersucht. Diese Analysen wurden von Marina Pana (ROM, unveröffentlichte Daten) und Radoslav Izdebsky (PL, Izdebsky *et al.*, 2007) in Kaiserslautern durchgeführt. In Stämmen, deren PBP2a eine erniedrigte Affinität zu Bocillin zeigte, wurden die DNA-Sequenz der Transpeptidase-Domäne von PBP2a ermittelt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit bereits publizierten PBP2a-Sequenzen von hochresistenten *S. pneumoniae* und unveröffentlichten Daten hochresistenter oraler Streptokokken aus der Arbeitsgruppe (Tab. 4.3) verglichen (Abb. 4.9).

Tab. 4.3: Streptokokken-Stämme des PBP2a-Alignments (Abb. 4.9)

| Stamm                             | Bemerkungen                            | MHK PEN[µg/ml]   | Literatur                       | Sequenzquelle                                |
|-----------------------------------|--|------------------|---------------------------------|--|
| <i>S. p.</i> SA8249               | PEN <sup>r</sup> , niederaffines PBP2a | 6                | Dowson <i>et al.</i> , 1989     | Mark van der Linden, unveröffentlichte Daten |
| <i>S. p.</i> U11                  | PEN <sup>r</sup>                       | 2                | Reichmann <i>et al.</i> , 1996  | Rutschmann, 2003                             |
| <i>S. p.</i> Cz29044              | PEN <sup>r</sup> , niederaffines PBP2a | 16               | Dowson <i>et al.</i> , 1989     | Mark van der Linden, unveröffentlichte Daten |
| <i>S. p.</i> R6 T5 <sub>ccc</sub> | PEN <sup>r</sup> , niederaffines PBP2a | 0,05 (CTX=12-16) | Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998  | Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998               |
| <i>S. p.</i> TIGR4                | PEN <sup>s</sup>                       | -                | Tettelin <i>et al.</i> , 2001   | NBC, TU Kaiserslautern                       |
| <i>S. p.</i> 670                  | PEN <sup>r</sup> , niederaffines PBP2a | 2                | Hakenbeck <i>et al.</i> , 1991  | NBC, TU Kaiserslautern                       |
| <i>S. p.</i> EU13                 | PEN <sup>r</sup>                       | 1,5              | Figueiredo <i>et al.</i> , 1995 | Rutschmann, 2003                             |
| <i>S. p.</i> Hu17                 | PEN <sup>r</sup>                       | 14               | Reichmann <i>et al.</i> , 1996  | NBC, TU Kaiserslautern                       |
| <i>S. m.</i> 12261                | PEN <sup>s</sup>                       | -                | www.tigr.org                    | NBC, TU Kaiserslautern                       |
| <i>S. p.</i> Isolat 1             | PEN <sup>r</sup>                       | 1,5              | Smith <i>et al.</i> , 2005      | NCBI   |
| <i>S. p.</i> 00084                | CTX <sup>r</sup>                       | 4 (CTX 8)        | Sanbongi <i>et al.</i> , 2004   | NCBI   |

Die Stämme, mit denen auch *in vivo* gearbeitet wurde, sind im Material-Teil (Tab. 2.2 & 2.3) beschrieben; PEN=Benzylpenicillin; CTX=Cefotaxim;

|                        |                                     |        |
|------------------------|-------------------------------------|--------|
|                        | 2222223333333333444444444455555666  |        |
|                        | 6788899025556688911234567802447034  |        |
|                        | 8923604144591569314513416465676136  |        |
| <i>S. p.</i> R6        | QNTEETHITTSREFQDTTPGQKRSDESEASTEAN  |        |
| <i>S. m.</i> B6        | .....A.....A..L..A.....KDT.         |        |
| <i>S. p.</i> R6 T5 CCC | .....A.....A..L..A.....KDT.         |        |
| <i>S. p.</i> U11       | .....A.....L..A.....D..             |        |
| <i>S. p.</i> 00084     | .....A.....L..A.....D..             |        |
| <i>S. p.</i> Isolat 1  | .....AS..L..A.....D..               |        |
| <i>S. p.</i> SA8249    | .TP..N.FP.A.....A..L..A.....        |        |
| <i>S. p.</i> Cz29044   | .....K.....A..L..A.....             |        |
| <i>S. p.</i> 40        | .....I.....A..L..A.....             | PL 23F |
| <i>S. p.</i> 2904      | .....I.....A..L..A.....             | PL 23F |
| <i>S. p.</i> k-585     | .....I.....A..L..A.....             | PL 23F |
| <i>S. p.</i> k-598     | .....A.....L..A.....KD..            | PL 23F |
| <i>S. p.</i> k-637     | .....I.....A..L..A.....             | PL 23F |
| <i>S. p.</i> 909       | .....I.....A..L..A.....             | PL 23F |
| <i>S. p.</i> TIGR4     | ...K.....S...A.....                 |        |
| <i>S. p.</i> EU13      | .....I.....A.....N....              |        |
| <i>S. p.</i> 670       | .....A.....A.....N....              |        |
| <i>S. p.</i> 2349      | K.....A.....                        |        |
| <i>S. p.</i> 657       | .....I.....A.....                   | PL 6B  |
| <i>S. p.</i> 2907      | .....I.....A.....                   | PL 6B  |
| <i>S. p.</i> 4134      | .....I.....A.....                   | PL 6B  |
| <i>S. p.</i> k-421     | .....I.....A.....                   | PL 6B  |
| <i>S. p.</i> M34       | .....A.....A.....                   |        |
| <i>S. p.</i> M76       | .....A.....A.....N....              |        |
| <i>S. p.</i> M116      | ...K.....S...A.....                 |        |
| <i>S. p.</i> Hu17      | .....A.....A.....                   |        |
| <i>S. mitis</i> 12261  | .....A...G.....A.....               |        |
| <i>S. oralis</i> Uo5   | .K...GAQ...AI.HRGP....QPAEDGGK....S |        |

Abb. 4.9: Alignment der PBP2a-Sequenzen von *S. pneumoniae*, *S. mitis* und *S. oralis*. Nur die Positionen, bei denen Abweichungen von der Sequenz von *S. p.* R6 auftreten, sind gezeigt. Aminosäuren, die der Sequenz von *S. p.* R6 entsprechen sind durch Punkte ersetzt. Die polnischen Isolate (Idzebsky *et al.*, 2007) und deren Serotypen sind auf der rechten Seite markiert.

Im Gegensatz zu klinischen PBP2x, 1a oder 2b-Varianten treten in dem hier durchgeführten Alignment von PBP2a-Sequenzen keine Mosaikblöcke auf. In den Transpeptidaseregionen (Q<sub>286</sub>-N<sub>646</sub>) von PBP2a der untersuchten resistenten Isolate weichen lediglich 4-9 AS (1 - 2,3 %) von der R6-Sequenz ab. Die am häufigsten auftretende Mutation, die bei 11 von 26 analysierten Sequenzen vorkommt, ist der Austausch von T<sub>411</sub> zu A. Alle elf Stämme dieser Gruppe sind Cefotaxim-resistent. Aminosäure 411 liegt in der konservierten STIK-Box direkt neben dem katalytisch aktiven Serin. Diese Mutation bereits für das ebenfalls im Alignment aufgeführt klinische Isolat *S. p.* 00084 aus Japan beschrieben, dem einzigen von 40 untersuchten Japanischen Isolaten, das hochresistent gegen Cefotaxim war (Sanbongi *et al.*, 2004).

Die Mutation T<sub>411</sub>>A ist in allen 11 untersuchten Fällen mit einem zweiten Aminosäureaustausch gekoppelt. Hierbei wird Q<sub>431</sub> durch ein L ersetzt. Der Einfluss dieser beiden Mutationen auf Affinität und Resistenz wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht (siehe 4.2.3).

Ein großer Teil der in Abb. 4.9 verglichenen PBP2a-Sequenzen stammt aus Isolaten, die zwischen 1993 und 2002 in Polen isoliert wurden. Diese Stämme waren bezüglich Serotyp,  $\beta$ -Lactam-Resistenz und der Sequenzen der PBP2x, 2b und 1a-Gene charakterisiert (Izdebsky *et al.* 2007). Sechs der untersuchten Isolate gehören demnach zum Sequenztyp PL<sup>23F</sup>-16. Diese Gruppe zeigt eine durchweg höhere  $\beta$ -Lactam-Resistenz die des Sequentyps PL<sup>6B</sup>-20. Beide Gruppen zeigen auch unterschiedliche Sequenzvarianten bei den PBPs 2x, 2b und 1a (Izdebsky *et al.* 2007). Die Analyse der PBP2a-Sequenz zeigte, dass die Stämme mit Serotyp 23F die T<sub>411</sub>>A- und die Q<sub>431</sub>>L Mutation aufweisen, während dies bei den Vertretern von Serotyp 6B nicht der Fall ist.

Abgesehen von den Veränderungen in der Transpeptidase-Domäne fiel bei *Streptococcus mitis* B6 auf, dass das codierte Protein um zwei Aminosäuren länger ist als die untersuchten Vergleichssequenzen (Abb. 4.10). Eine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität und damit auf die Bindungseigenschaften von PBP2a-B6 ist allerdings unwahrscheinlich. Die Ursache ist die Integration des *S. mitis* B6-spezifischen IS-Elements ISSmi1 (Denapaita *et al.*, 2010). IS-Elemente im Bereich stromabwärts von *pbp2a* wurden in drei *S. pneumoniae*-Isolaten aus Japan beschrieben (Sanbongi *et al.*, 2004). Diese liegen jedoch gänzlich außerhalb des codierenden Bereichs und führen daher nicht zu einer Veränderung des *pbp2a*-kodierten Proteins.

|             |    |       |   |
|-------------|----|-------|---|
| <i>S.p.</i> | R6 | PBP2a | TIWDSIVNLF <sup>R</sup> *                 |
| <i>S.m.</i> | B6 | PBP2a | TIWDSVVNLF <sup>R</sup> G <sup>NF</sup> * |

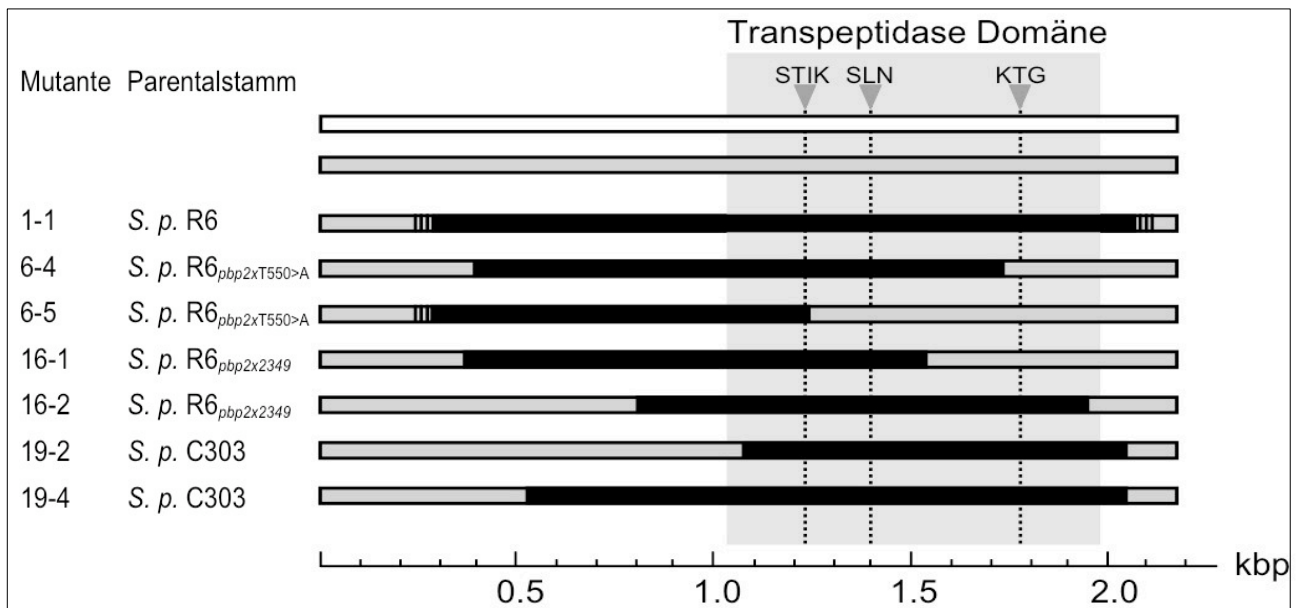
Abb. 4.10: C-terminus von PBP2a-*S. mitis* B6 im Vergleich mit PBP2a von *S. pneumoniae* R6 beginnend bei T<sub>721</sub>. Unterschiede sind hellgrau hinterlegt.

#### 4.2.2 PBP2a von *S. mitis* B6 und Resistenz

*S. mitis* B6 ist ein extrem hoch Penicillin- und Cefotaxim-resistenter Stamm. Die Resistenz lässt sich weitgehend auf *S. pneumoniae* übertragen, wobei nach mehreren Transformationsschritten bis zu fünf PBPs in den Transformanten verändert vorliegen (Hakenbeck *et al.*, 1998). Bei der Transformation mit chromosomaler DNA von *S. m.* B6 in *S. p.* R6 unter Selektion mit Cefotaxim wird das für ein niederaffines PBP2a kodierende Allel in der zweiten Selektionsstufe übertragen, direkt nach *pbp2x*. Vermittelt dieses niederaffine PBP2a folglich eine erhöhte Cefotaxim-Resistenz und wenn ja, unter welchen Voraussetzungen? Dieser Fragestellung wurde durch Transformation des klonierten *pbp2a*-Allels von *S. mitis* B6 in ausgewählte *S. pneumoniae*-Stämme nachgegangen.

Dafür wurde zunächst das *S. mitis* B6 *pbp2a* kloniert. Aus chromosomaler DNA von *S. mitis* B6 wurde der Bereich zwischen C<sub>-253</sub> und G<sub>2167</sub> amplifiziert. Das ca. 2,4 kb große PCR-Produkt wurde in pGEM T-easy kloniert und in *E. coli* DH5α transformiert. Mit 9 Transformanten wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Von 5 mittels Restriktion überprüften Transformanten wurde bei drei Plasmiden das Insert sequenziert. Ein Klon (B8G) zeigte keine Abweichungen zur *pbp2a*-Sequenz von *S. mitis* B6 und wurde zur Transformation von *S. pneumoniae* verwendet.

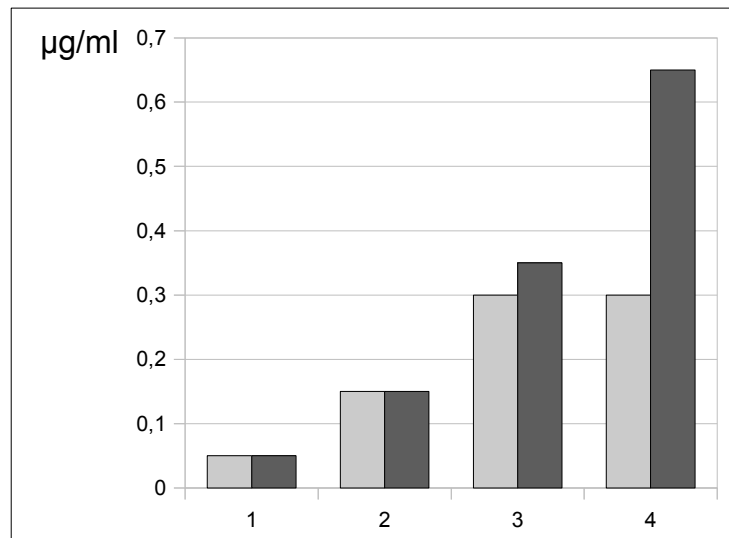
Die Einführung von *pbp2a*<sub>B6</sub> in Rezipientenstämme erfolgte wie bei 4.1.3 beschrieben mit der Janus-Kassette. Das klonierte *pbp2a*-Allel von *S. mitis* B6 wurde in *S. p.* R6, *S. p.* C303, *S. p.* R6<sub>*pbp2x*T550>A</sub> und *S. p.* R6<sub>2x2349</sub> transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden durch PBP-Bindungsstudien überprüft und Klone mit niederaffinem PBP2a anschließend sequenziert. Die erhaltene *pbp2a*-Sequenz wurde mit den Daten von *S.p.* R6 und *S.mitis* B6 verglichen. Die Größe der rekombinierten *pbp2a*<sub>B6</sub>-Bereiche ist in Abb. 4.11 dargestellt.



**Abb. 4.11:** Größe der rekombinierten *pbp2a*<sub>B6</sub>-Bereiche sequenzierter Transformanten. Die Endpunkte der markierten Bereiche beziehen sich auf das erste B6-spezifische Nukleotid von *pbp2a*. Parentalstämme der jeweiligen Transformanten: 1-1 = *S. p. R6*; 6-4, 6-5 = *S. p. R6*<sub>*pbp2xT550>A*</sub>; 16-1, 16-2 = *S. p. R6*<sub>*pbp2x2349*</sub>; 19-2, 19-4 = *S. p. C303*. Das Protein PBP2a (weiß), die Lage der Transpeptidase-Domäne und die konservierten Boxen des aktiven Zentrums (STIK, SLN, KTG) sind schematisch dargestellt. Schwarz = *S. m.* B6-DNA-Sequenz; grau = *S. p. R6*-DNA-Sequenz; gestrichelt Enden der schwarzen Balken zeigen an, wo die B6-Sequenz über den sequenzierten Bereich hinausgeht. Das Alignment zur Abbildung ist im Anhang gezeigt.

Ausgewählte Transformanten wurden auf ihre Cefotaxim-MHK untersucht (Abb. 4.12).





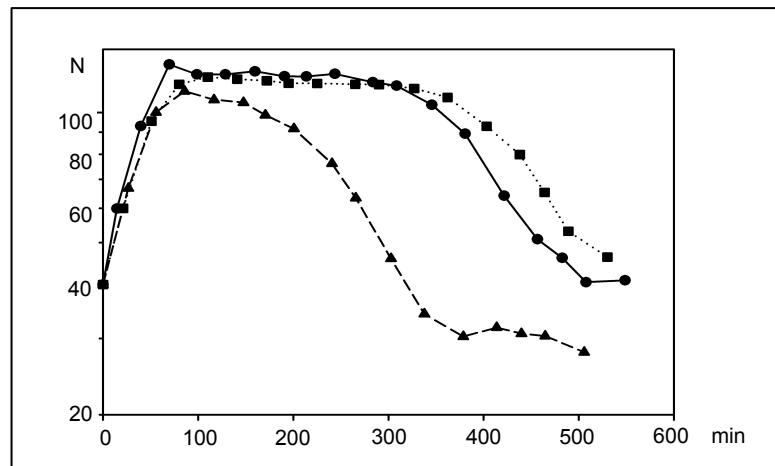
**Abb. 4.12:** MHK der Janus-*pbp2a*<sub>B6</sub>-Transformanten (dunkelgrau) und ihrer Ausgangsstämme (hellgrau): *S. p.* R6 (1; Transformant 1-1); *S. p.* R6<sub>*pbp2xT550>A*</sub> (2; Transformant 6-4); *S. p.* C303 (3; Transformant 16-2); *S. p.* R6<sub>*pbp2x2349*</sub> (4; Transformant 19-2) Die Bestimmung erfolgte in Konzentrationsschritten von 0,05 µg/ml in 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils doppeltem Ansatz. Bei *S. p.* R6<sub>*pbp2xT550>A*</sub> (6-4) wurde nur ein Teil der Transpeptidase-Domäne übertragen (siehe Abb. 4.11).

Die Transformation des *pbp2a*-Allels von *S. mitis* B6 in *S. pneumoniae* R6 führte zu keiner Veränderung in der Resistenz gegen Cefotaxim über einen Wert von 0,05µg/ml hinaus. Das kodierte niederaffine PBP2a stellt demnach keine primäre Resistenzdeterminante dar. Im Stamm *S. p.* R6<sub>*pbp2xT550>A*</sub> ist ebenfalls kein Unterschied zwischen Ausgangsstamm und Transformant zu erkennen. Hier ist jedoch zu beachten, dass bei dem im Experiment verwendeten Klone 6-4 nicht die gesamte Transpeptidase-Domäne von *pbp2a*<sub>B6</sub> übertragen wurde (siehe Abb. 4.11).

Der deutlichste Anstieg der Cefotaxim-MHK zeigte sich bei der Aufnahme des *pbp2a*-Allels von *S. mitis* B6 in den Stamm *S. p.* R6<sub>*pbp2x2349*</sub>. Die Kombination der beiden niederaffinen PBPs (Transformant 16-2) führt zu einer Verdopplung der MHK im Vergleich zu *S. p.* R6<sub>*2x2349*</sub> mit Wildtyp-PBP2a. Allerdings ist hierfür offenbar notwendig, dass die gesamte Transpeptidasedomäne rekombiniert ist. Im Transformant 16-1, in dem sich der B6 „Mosaik-Block“ lediglich über die STIK- und die SLN-Box erstreckt, wurde bei zwei voneinander unabhängigen MHK-Bestimmungen sogar ein minimaler Abfall der MHK (0,3 auf 0,25 bzw. 0,35 auf 0,3 µg/ml CTX) detektiert.

Die Aufnahme des B6-Allels führte bei C303 zu einer leichten Erhöhung der MHK. Diese Differenz zeigte sich in allen durchgeführten Experimenten. Die hierzu verwendeten Transformanten 19-2 und 19-4 unterscheiden sich zwar bezüglich der Länge der rekombinierten B6-Sequenz, doch erstreckt sie sich bei beiden über alle 3 konservierten Boxen.

Zusätzlich zur Auswirkung auf die Cefotaxim-Resistenz wurde auch der Einfluß des B6-Allels auf Wachstum und Lyse überprüft.



**Abb. 4.13:** Wachstum und Lyse von *S. pneumoniae* mit und ohne *pbp2a*<sub>B6</sub>. Eine Vorkultur von *S. p.* R6 (●) und *S. p.* R6<sub>pbp2a</sub> S.m.B6 (■) wurde in vorgewärmtes C-Medium 1:50 verdünnt, und das Wachstum zu den angegebenen Zeiten mit dem Nephelometer gemessen. Die Daten für *S. p.* R6<sub>pbp2a</sub> C403 (▲) wurden zum Vergleich angegeben.

Das niederaffine PBP2a, ähnlich wie das Ausschalten von PBP2a (siehe *S.p.* R6<sub>pbp2a</sub> C403) verursachte ein langsames Wachstum. Die Generationszeit von R6<sub>pbp2a</sub> S.m.B6 beträgt 39 min, verglichen mit 27 min bei *S. p.* R6. Hingegen durchläuft *S. p.* R6<sub>pbp2a</sub> S.m.B6 eine etwas längere stationäre Phase als *S. p.* R6 und lysiert zwar etwas später aber mit ähnlicher Rate wie der Parentalstamm, während bei R6<sub>pbp2a</sub> C403 eine schnelle Lyse sofort nach Erreichen der größten Zelldichte einsetzt. Das bedeutet, dass auch ein niederaffines PBP2a Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aminosäureänderungen von PBP2a<sub>B6</sub> einen Einfluß auf die Aktivität von PBP2a haben könnten.

Die Versuche belegen, dass das niederaffine PBP2a aus *S. mitis* B6 zu einer Resistenzhöhung führen kann, wobei auch hier die Höhe der Resistenz abhängig ist von dem anwesenden *pbp2x*-Allel. Besonders hohe Resistenz wird in Gegenwart eines Mosaik-*pbp2x* erreicht, das für ein nieder-affines PBP2x kodiert.

### 4.2.3 *pbp2a*-Allele mit definierten Punktmutationen

In niederaffinen PBP2a-Varianten klinischer Streptokokken-Isolate treten eine Reihe unterschiedliche Punktmutationen auf (siehe 4.2.1.) Die Anzahl der Aminosäure-Unterschiede zwischen diesen PBPs und der Wildtyp-Sequenz ist allerdings nicht so hoch wie bei den für PBP2x beschriebenen Mosaik-Blöcken (Sibold *et al.*, 1994).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleichen von PBP2a aus klinischen Streptokokken-Isolaten trat eine Mutation in der STIK-Box der Transpeptidase-Domäne ausschließlich in  $\beta$ -lactam-resistenten Stämmen auf und gilt daher als Kandidat für eine Beteiligung am Resistenzphänotyp. Daher wurde die Mutation T<sub>411</sub>>A über gezielte Mutagenese in *S. p.* R6 und *S. p.* R6<sub>*pbp2x2349*</sub> eingebracht, da im letzteren Fall ein Effekt auf die Resistenz am ehesten detektierbar sein sollte.

In allen untersuchten Stämmen, die den T<sub>411</sub>>A-Austausch aufweisen ist eine zweite Mutation zu finden, die 18 Aminosäuren weiter in C-terminaler Richtung auftritt: Q<sub>431</sub>>L; Daher wurden Doppelmutanten dargestellt und ebenfalls analysiert.

Zur Untersuchung der Mutation T<sub>411</sub>>A wurde mittels PCR mit punktmutierten Oligonukleotid-Primern ein *pbp2a*-Allel dargestellt, welches sich nur in einem Nukleotid (A<sub>1231</sub>>G) von der Wildtyp-Sequenz unterscheidet, und auf Proteinebene zum Austausch von Threonin<sub>411</sub> zu Alanin führt. Dieses Allel wurde *pbp2a*<sup>\*A</sup> genannt und in pGEM T-easy kloniert. Nach Überprüfung der DNA-Sequenz des klonierten Bereichs wurde die Mutation mittels Janus-Transformation in *S. p.* R6 eingeführt.

Zur Darstellung der Doppelmutante wurde im Allel *pbp2a*<sup>\*A</sup> zusätzlich die Punktmutation A<sub>1292</sub>>T eingeführt, was zum Q<sub>431</sub>>L-Austausch führt. Das so erhaltenene *pbp2a*<sup>\*AL</sup> wurde analog zu *pbp2a*<sup>\*A</sup> kloniert, überprüft und transformiert. Zusätzlich wurde dieses Allel in *S.p.* R6<sub>*pbp2x2349*</sub> eingebracht.

Fünf Transformanten der jeweiligen Ansätze wurden mittels PBP-Bindungsstudien überprüft (Abb. 4.15) und 2 Transformanten mit niederaffinem PBP2a der Sequenzanalyse zugeführt (jeweils die Transformanten 1+2). Pro Ansatz enthielt mindestens ein Transformant die gewünschte Punktmutation (jeweils Transformant Nr. 1).

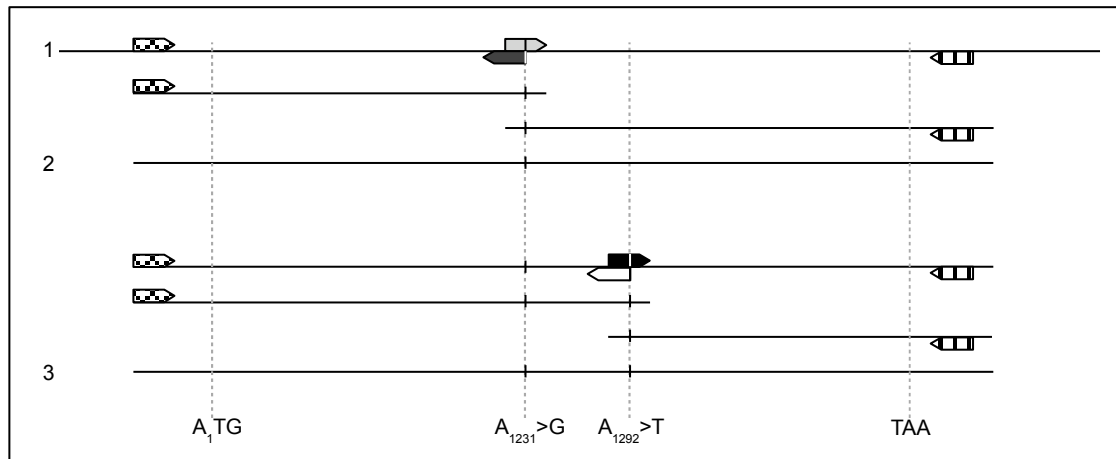


Abb. 4.14: Schema der Darstellung von *pbp2a*-PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen. 1 = chromosomale DNA von *S.p.* R6; 2 = *pbp2a*<sup>\*Δ</sup>; 3 = *pbp2a*<sup>\*AL</sup>; Primer: 2a1U (rautiert), 2a2268r (gestreift), 2aT>Af (hellgrau), 2aT>Ar (dunkelgrau), 2aQ>Lf (schwarz), 2aQ>Lr (weiß); Die Positionen des Start und Stop-Codons, sowie die eingefügten Mutationen sind mit grau gestrichelten Linien angedeutet.

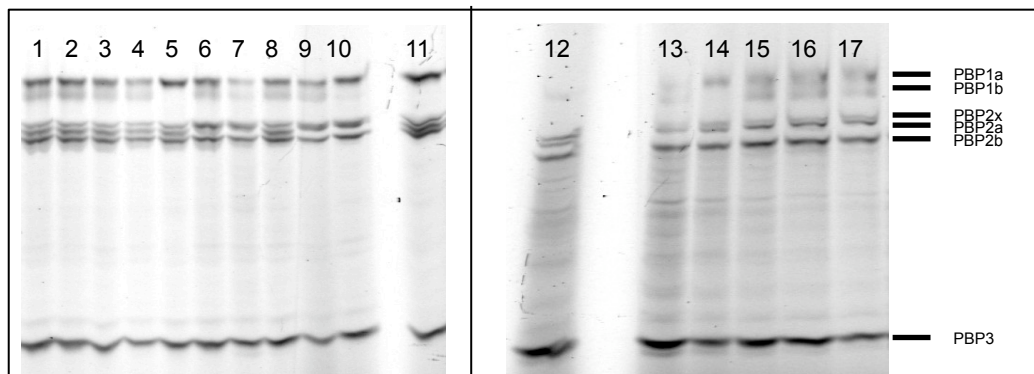


Abb. 4.15: Analyse Bocillin-markierter *S. p.*-Lysate mit dem Fluorimager nach SDS-PAGE. Janus-*pbp2a*<sup>\*Δ</sup>-Transformanten von R6 (Transformanten 1-5 auf den Spuren 1-5); Janus-*pbp2a*<sup>\*AL</sup>-Transformanten von R6 (Transformanten 1-5 auf den Spuren 6-10); R6-Lysat als Kontrolle (Spur 11 und 12); Janus-*pbp2a*<sup>\*AL</sup>-Transformanten von R6<sub>*pbp2x2349*</sub> (Transformanten 1-5 auf den Spuren 13-17). Die Lage der PBPs ist auf der rechten Seite schematisch dargestellt.

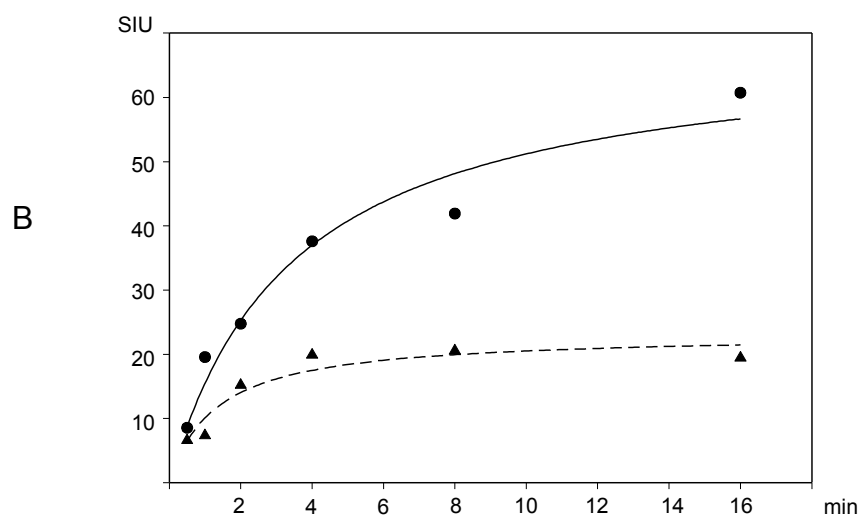
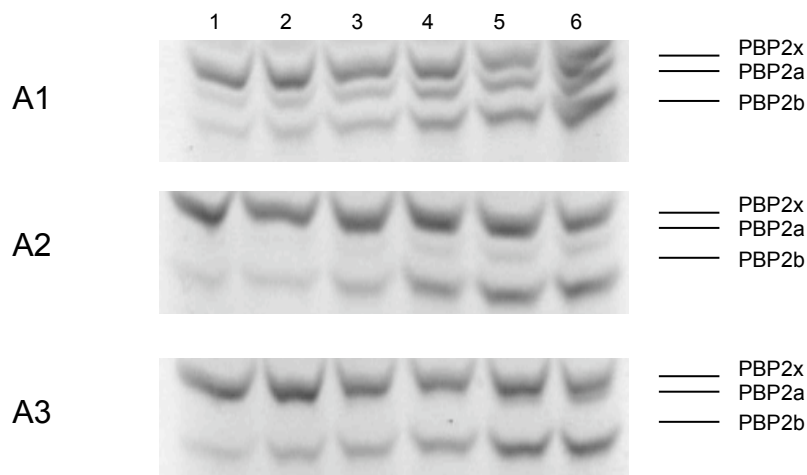
Die mittels Bindungsstudien und *pbp2a*-Sequenzanalyse überprüften Transformanten von *S. p.*R6 wurden gemeinsam mit dem Ausgangsstamm auf ihre Affinität gegenüber Bocillin FL untersucht, um die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Proteins zu testen.

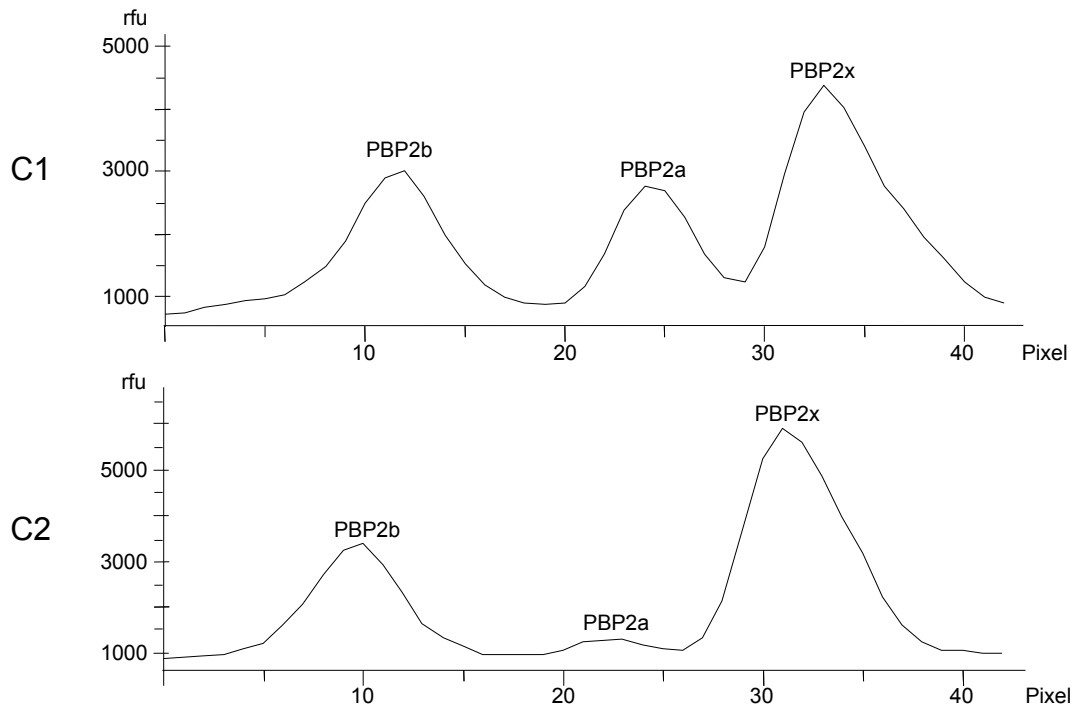
Schon in den Bocillin-Bindungsstudien zur Überprüfung der *pbp2a*<sup>\*Δ</sup>- und *pbp2a*<sup>\*AL</sup>-Transformanten zeigte sich eine deutlich verringerte Affinität des mutierten PBP2a. Bei der Doppelmutante mit dem Allel *pbp2a*<sup>\*AL</sup> konnte PBP2a nicht mehr detektiert werden.

Zur Quantifizierung des Einflusses dieser Mutationen auf die Affinität zu  $\beta$ -Lactamen wurden Bindungskinetiken von der Mutanten gegen den Wildtyp erstellt .

Zellysate wurden mit  $4,8\mu\text{M}$  Bocillin bei  $15^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 30 s, 1, 2, 4, 8 und 16 min wurden Proben von  $7,35\ \mu\text{l}$  entnommen. Die Bindung von Bocillin an im Zellysat enthaltene PBPs wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und sofortiges Erhitzen auf  $96^\circ\text{C}$  gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und FluorImager analysiert (Abb. 4.16A).

Die Intensitäten der PBP2a-Banden von *S. p.* R6 und *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A</sub> wurde mit dem Programm Scion-Image ermittelt (Abb. 4.16 B). Ein Querschnitt der Bandenintensität des PBP2xab-Triplets dieser beiden Stämme nach 4 min Inkubation wurde mit ImageQuant erstellt und ist unter Abb. 4.16 C zu sehen.





**Abb. 4.16:** Einfluß von Mutationen in PBP2a auf die  $\beta$ -Lactam-Bindung. PBPs in Bocillin-markierten *S.p.*-Lysaten wurden nach SDS-PAGE mit dem Fluorimager detektiert: *S. p.* R6 (A1), *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A</sub> (A2), *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A, Q431L</sub> (A3); Die Proben wurden nach den jeweiligen Inkubationszeiten sortiert aufgetragen: 1 = 30s, 2 = 1min, 3 = 2min, 4 = 4min, 5 = 8min, 6 = 16min; Die Lage der PBPs ist auf der rechten Seite schematisch dargestellt. B: Graphische Darstellung der Bandenintensität [SIU = Scion Image Units] von PBP2a in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [min]. *S. p.* R6 (Kreise, Regression = durchgezogene Linie), *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A</sub> (Dreiecke, Regression = gestrichelte Linie); C: Bandenintensität [relative fluorescence units, rfu] des PBP2xab-Triplets von *S. p.* R6 (C1) und *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A</sub> (C2) in Abhängigkeit von der Laufstecke im SDS-Gel [Pixel]. Hierzu wurden Standardproben 4min bei 15°C mit 4,8 $\mu$ M Bocillin (final) inkubiert.

Beim direkten Vergleich der Bocillin-Bindung von PBP2a in der Wildtyp- und T<sub>411</sub>A-Variante zeigt sich, dass die mutierte Form eine deutliche geringere Affinität zu diesem  $\beta$ -Lactam hat. Alle anderen PBPs reagieren in Wildtyp und Mutante gleich. Die Bindung, die das Wildtyp-PBP2a nach 1 min Inkubationszeit aufweist, ist in der PBP2a Mutante erst nach 4 min erreicht. Nach 8- bzw. 16- minütiger Inkubation verändert sich dieser Wert bei der Mutante nicht mehr, während beim Wildtyp auch nach 16min noch keine Sättigung zu erkennen ist. Somit ist der Effekt der Mutationen auf die enzymatische Aktivität von PBP2a eindeutig belegt.

Die PBP2a-Bande der Doppelmutante *S. p.* R6<sub>PBP2a T411A, Q431L</sub> ist in Abb. 4.16 (A3) kaum zu erkennen, da diese Mutationen zu einer Veränderung des Laufverhaltens führen und die Banden von PBP2x und PBP2a fast auf der gleichen Höhe liegen. Diese Verschiebung verhindert eine Messung der Bandenintensität mit der verwendeten Software. Auf den Spuren 5 und 6 sind die Banden von PBP2x und PBP2a getrennt voneinander zu erkennen. Die Intensität der PBP2a-Banden ist hier ähnlich im Vergleich zu den PBP2a-Banden der Mutante *S.p.* R6<sub>PBP2a T411A</sub>. Somit führt die zweite Mutation wahrscheinlich zu keiner weiteren Veränderung der Affinität, aber zu einer Modifikation des Laufverhaltens bei der SDS-Page.

Die Cefotaxim MHK der *pbp2a*<sup>\*A</sup> – und *pbp2a*<sup>\*AL</sup>-Transformanten wurde im Vergleich zu den Parentalstämmen Stämme *S.p.* R6 und *S.p.* R6<sub>pbp2x2349</sub> getestet. Im R6-Hintergrund bewirkten die mutierten Allele *pbp2a*<sup>\*A</sup> und *pbp2a*<sup>\*AL</sup> keinen Anstieg der Cefotaxim-Resistenz über 0,05 µg/ml. Dies war zu erwarten, da bereits das niederaffine PBP2a von *S. mitis* B6 im R6-Hintergrund keinen derartigen Effekt zeigte und PBP2a nicht zu den bisher beschriebenen primären Resistenzdeterminanten (Grebe und Hakenbeck, 1996) gehört. Auch die Transformanten des Stamms *S. p.* R6<sub>pbp2x2349</sub> mit den mutierten Allelen *pbp2a*<sup>\*A</sup> und *pbp2a*<sup>\*AL</sup> wiesen keine Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz über 0,05 µg/ml auf. Aufgrund der Ergebnisse zur Cefotaxim Suszeptibilität der *pbp2a*<sub>B6</sub>-Transformanten von *S. p.* R6<sub>pbp2x2349</sub>, wo eine nur teilweise Übertragung der Tranpeptidase-Domäne nicht zu einem MHK-Anstieg führte, wurde eine detailliertere Abklärung nicht weiter verfolgt.

Die Versuche zeigen, dass Mutationen in der Nähe des aktiven Serins von PBP2a zu einer erniedrigten Affinität für β-Lactame führen. Allerdings bewirken sie keine Resistenzhöhung in Stämmen mit verändertem PBP2x. Die Resistenzvermittlung muß daher an andere Veränderungen von PBP2a oder die Kombination mehrerer Mutationen gekoppelt sein.

### 4.3 Inaktivierung des *cia*-Systems in *pbp2a*-Transformanten

Das *Cia*-System ist notwendig, um normales Wachstum in *PBP2x*-Mutanten zu garantieren. Die *ciaH*-Mutation in C103 führt in Kombination mit den *pbp2x*-Mutationen aus C203 und C303 zu einer Aktivierung des *Cia*-Systems (Mascher *et al.*, 2006). Wird in C303 diese Aktivierung durch eine Inaktivierung von *ciaRH* verhindert, führt dies zu einer Mutante mit längerer Generationszeit, verstärkter Autolyse und veränderter Zellmorphologie (Mascher *et al.*, 2006).

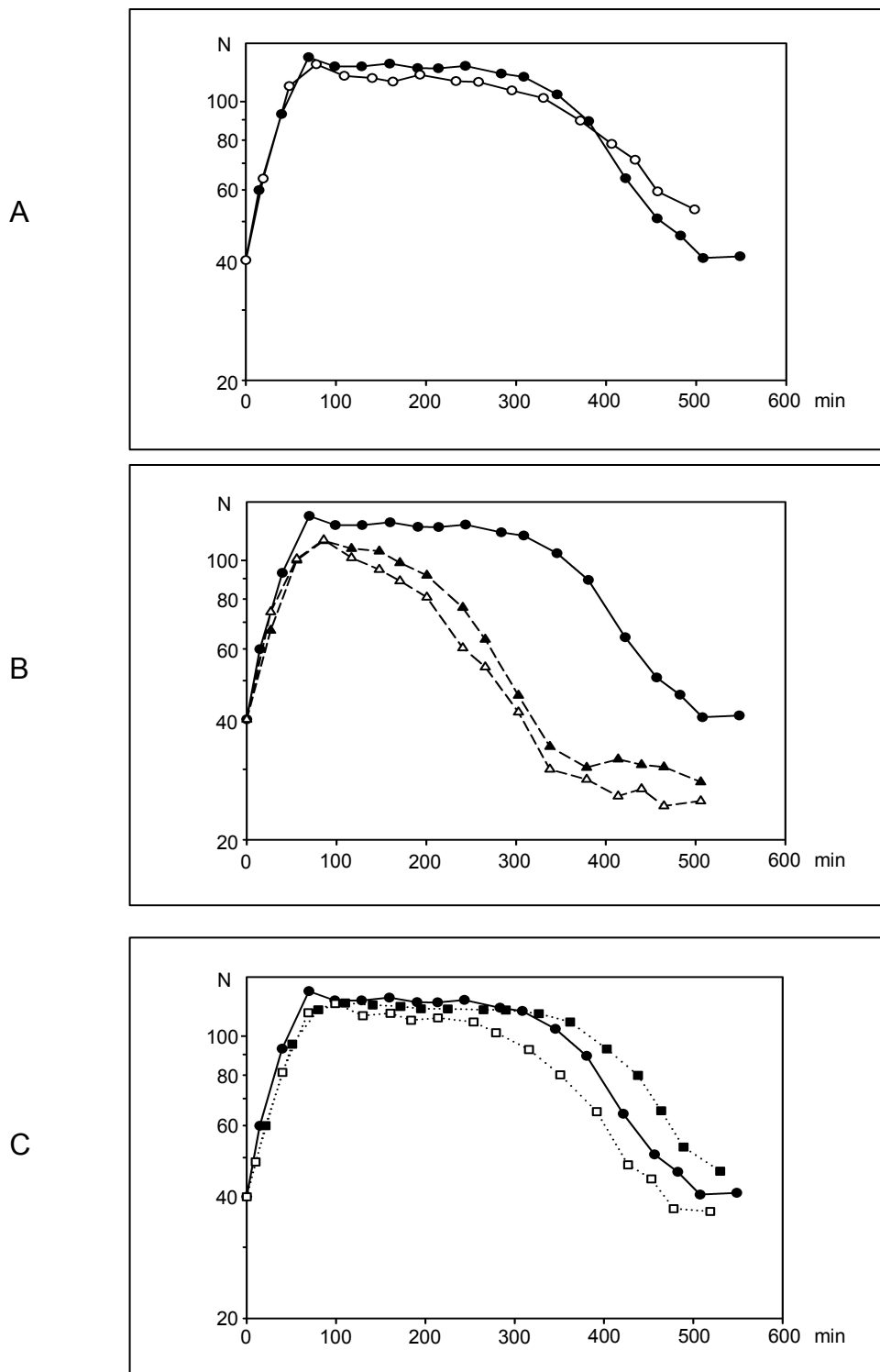
In den mit Cefotaxim selektionierten Labormutanten traten in drei Mutanten-Familien Mutationen in *pbp2a* auf (Laible *et al.*, 1987). In allen drei Fällen waren zuvor bereits Mutationen in *ciaH* aufgetreten (Guenzi *et al.*, 1994). Darunter ist auch die bereits oben beschriebene Mutation im *ciaH* von C103 (Tab. 1.1).

*CiaH*-Mutationen könnten demnach eine Voraussetzung für *pbp2a*-Mutationen in den Cefotaxim-selektionierten Labormutanten sein. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang ein ähnlicher Effekt auf das Wachstum wie bei *pbp2x*. Zur Klärung dieser Frage wurde das Wachstums- und Lyseverhalten der *pbp2a*-Mutanten mit und ohne funktionsfähiges *CiaRH*-System verglichen.

Derivate mit inaktiviertem *ciaRH* wurden aus den zuvor beschriebenen *pbp2a*-Mutanten von *S. p.* R6 dargestellt. *S. p.* R6<sub>*pbp2a* C403</sub> und *S. p.* R6<sub>*pbp2a* S.m.B6</sub> wurden mit PCR-Produkten der in *ciaR* integrierten Spectinomycin-Resistenz-Kassette (*aad9*) von *S. p.* R6<sub>*cia*OFF</sub> transformiert. Jeweils fünf Spectinomycin-resistente Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Alle Transformanten enthielten die Spectinomycin-Resistenz-Kassette.

Ausgewählte Transformanten wurden bezüglich Wachstum und Lyse mit den Ausgangsstämmen sowie *S. p.* R6 und *S. p.* R6<sub>*cia* OFF</sub> verglichen.





**Abb. 4.17:** Wachstum und Lyse von *S. pneumoniae* mit unterschiedlichen *pbp2a*-Allelen und aktivem bzw. inaktiviertem *ciaRH*. Eine Vorkultur von der Stämme wurde in vorgewärmtes C-Medium 1:50 verdünnt, und das Wachstum zu den angegebenen Zeiten mit dem Nephelometer gemessen: Die Werte für *S. p.* R6 (●;—) wurden bei allen Wachstums-kurven zum Vergleich angegeben; **A:** , *S.p.* R6 *ciaR::aad9* (○; —); **B:** *S. p.* R6<sub>*pbp2a* C403</sub> (▲;----), *S.p.* R6<sub>*pbp2a* C403</sub> *ciaR::aad9* (△;----); **C:** *S.p.* R6<sub>*pbp2a* S.m.B6</sub> (■;····) und *S.p.* R6<sub>*pbp2a* S.m.B6</sub> *ciaR::aad9* (□;····);

Die beiden Referenzstämme *S. p.* R6 (Generationszeit  $T_d = 27\text{min}$ ) und *S. p.* R6<sub>*ciaR::aad9*</sub> ( $T_d = 27\text{min}$ ) zeigen keine Unterschiede im Wachstum. Die Mutante erreicht allerdings nicht ganz die maximale Kulturtrübung des Wildtyps und zeichnet sich durch eine etwas langsamere Lyse aus.

In der Mutante mit *pbp2a*<sub>C403</sub>, d.h. mit einem inaktivierten PBP2a, hat die Inaktivierung von CiaR dagegen einen deutlichen Effekt auf die Generationszeit: Während die Transformante R6<sub>*pbp2a* C403 *ciaR::aad9*</sub> genauso schnell wächst wie *S. p.* R6, ist die Generationszeit von *S. p.* R6<sub>*pbp2a*C403</sub> ( $T_d = 39\text{min}$ ) deutlich länger. Beide Mutanten durchlaufen keine stationäre Phase und lysieren ähnlich schnell.

Im Falle der *pbp2a*<sub>B6</sub>-Derivate weist die *ciaRH*-Mutante ebenfalls die kürzere Generationszeit auf: *S. p.* R6<sub>*pbp2a* S.m.B6</sub> hat eine  $T_d = 40\text{min}$ , *S. p.* R6<sub>*pbp2a* S.m.B6 *ciaR::aad9*</sub> liegt der Wert bei  $T_d = 36,5\text{min}$ . Die Ausprägung dieses Phänomens ist jedoch deutlich geringer als bei *S. p.* R6<sub>*pbp2a* C403</sub>. Die Lyse der Mutante mit niederaffinem PBP2a setzt erst nach der von *S. p.* R6 ein, die ihrer *ciaRH*-Mutante jedoch deutlich vorher, wobei die Lyseraten wiederum ähnlich sind.

Zusammenfassend wird in dieser Versuchsreihe deutlich, dass auch bei PBP2a-Mutationen ein funktionierendes CiaRH System erforderlich ist, und die Deletion von CiaR zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führt.

## 4.4 Immunologische Analyse von PBP2x und PBP2a

Die Markierung von PBPs im SDS-Gel kann auf zwei grundsätzlich verschiedene Arten erfolgen. Einerseits kann vor der Elektrophorese ein markiertes  $\beta$ -Lactam kovalent an das PBP gebunden und nach der Auftrennung detektiert werden. Diese Reaktion ist abhängig von der Affinität des Enzyms gegen das  $\beta$ -Lactam; daher können besonders niederaffine PBP-Varianten oft nur schlecht oder gar nicht auf diese Weise dargestellt werden.. Weiterhin kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden, ob das PBP als niederaffine Variante vorliegt und daher schlecht markiert werden kann, oder ob weniger PBP in der Zelle vorhanden ist und daher weniger PBP- $\beta$ -Lactam-Komplex sichtbar ist.

Andererseits können PBPs als Proteine mit Hilfe von Antikörpern markiert und so sichtbar gemacht werden. Diese Reaktion ist unabhängig von der  $\beta$ -Lactam-Affinität und ermöglicht die Detektion einzelner PBPs. Dies gilt in besonderem Maße für niederaffine PBPs, und für solche, bei denen durch Punktmutationen oder variable Regionen bei Mosaikgenen das Laufverhalten im Gel verändert ist. Allerdings muss bei letzteren berücksichtigt werden, dass durch die Veränderungen der Aminosäuresequenz auch die Affinität spezifischer Antikörper beeinträchtigt sein kann, wenn diese gegen das Wildtyp-Protein generiert wurden.

Durch die Möglichkeit einzelne PBPs zu markieren können Antigen-Antikörperkomplexe besser quantifiziert werden als  $\beta$ -Lactam-PBP Komplexe.

### 4.4.1 Bestimmung der Anzahl von PBP2x-Molekülen pro Zelle

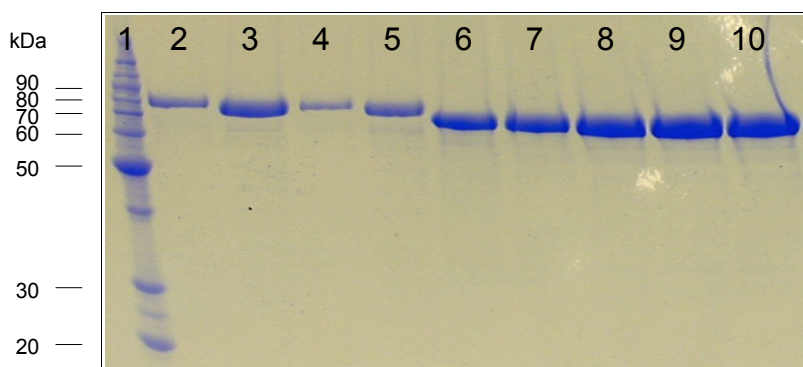
Die Affinität der PBPs von *Streptococcus pneumoniae*, insbesondere von PBP2x, PBP2b und PBP1a, gegen verschiedene  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurde in einer Reihe von Studien beschrieben. Sowohl die Quelle der Sequenzen, die eine erniedrigte Affinität verursachen, als auch die Auswirkungen einzelner Punktmutationen auf die Affinität sind untersucht (Review: Hakenbeck, 1999; Bergmann *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Punktmutationen und transformierten Allelen aus einem klinischen *Streptococcus mitis*-Isolat auf die Affinität von PBP2a untersucht.

Die Anzahl der PBPs pro Zelle hingegen wurde bisher erst in einer Studie untersucht, wobei dieses Thema nicht das Kernanliegen der Untersuchung war und daher lediglich die primären Resistenzdeterminanten PBP2x und PBP2b berücksichtigt wurden (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005). Auch für andere Bakterienarten liegt nur eine begrenzte Anzahl von

Studien zu dieser Thematik vor, so zum Beispiel für *Escherichia coli* (Spratt, 1977; Dougherty *et al.*, 1996) oder *Staphylococcus aureus* (Pucci und Dougherty, 2002).

Zunächst wurde PBP2x mit Hilfe von Antikörpern analysiert, da es eine primäre Resistenzdeterminante darstellt (Coffey *et al.*, 1996). Das heißt Mutationen in PBP2x vermitteln Resistenz ohne weitere PBP-Mutationen und PBP2x-Veränderungen sind notwendig um hohe Resistenzniveaus zu erreichen. Dieses essentielle PBP ist sowohl strukturell als auch physiologisch gut untersucht (Pares *et al.*, 1996; Grebe und Hakenbeck, 1996). Weiterhin liegen bereits Daten zur Molekülanzahl pro Zelle (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005) vor, die jedoch lediglich mit dem extrazellulären Anteil des PBP2x-Moleküls als Standard ermittelt wurden. Als Ergebnis dieses Experiments wurde eine Anzahl von 260 (+/-60) Molekülen pro cfu (=colony forming unit) publiziert.

Für die Mengenbestimmung von PBP2x wurde in einem ersten Schritt das lösliche PBP2x\*-Derivat in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Dafür wurde das Plasmid pGEX-6P-1-tet<sub>2x-sol</sub> verwendet, und das lösliche, überexprimierte Protein aus 2 l *E. coli* BL21 nach Induktion mit IPTG über eine GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurde das Zellysat auf eine 2 ml PBP2x-GSH-Sepharose Säule aufgetragen, und mit 8,5 ml CL-Puffer eluiert. I und II bezeichnen die Fraktionen, die in zwei aufeinanderfolgenden Elutionen mit je 4 ml erhalten wurden. Das erhaltene Protein wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 4.18) und die Proteinkonzentration photometrisch mit dem Nano-Drop bestimmt.



**Abb 4.18.:** Qualitive Bestimmung und quantitative Abschätzung der Elutionsfraktionen der PBP2x\*-Aufreinigung: 1 = BenchMark Protein Ladder ; 2 = 0,75 µl Elution 1; 3 = 1,5 µl Elution 1; 4 = 0,75 µl Elution 2; 5 = 1,5 µl Elution 2; 6-10 = 2, 3, 4, 5 und 6 µg BSA; Die Größenangaben zum Marker sind schematisch auf der rechten Seite dargestellt.

Die erhaltenen OD<sub>280</sub>-Werte für die beiden Elutionsfraktionen wurden in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Aus der Aminosäuresequenz berechnet das Computerprogramm Protean einen Korrekturfaktor (hier: 1,18 mg), der mit der gemessenen OD<sub>280</sub> multipliziert wird. Für die Messung der Fraktion I wurde nach der Abschätzung des Proteingehalts im SDS-Gel (Abb. 4.18) eine 1:10 Verdünnung eingesetzt.

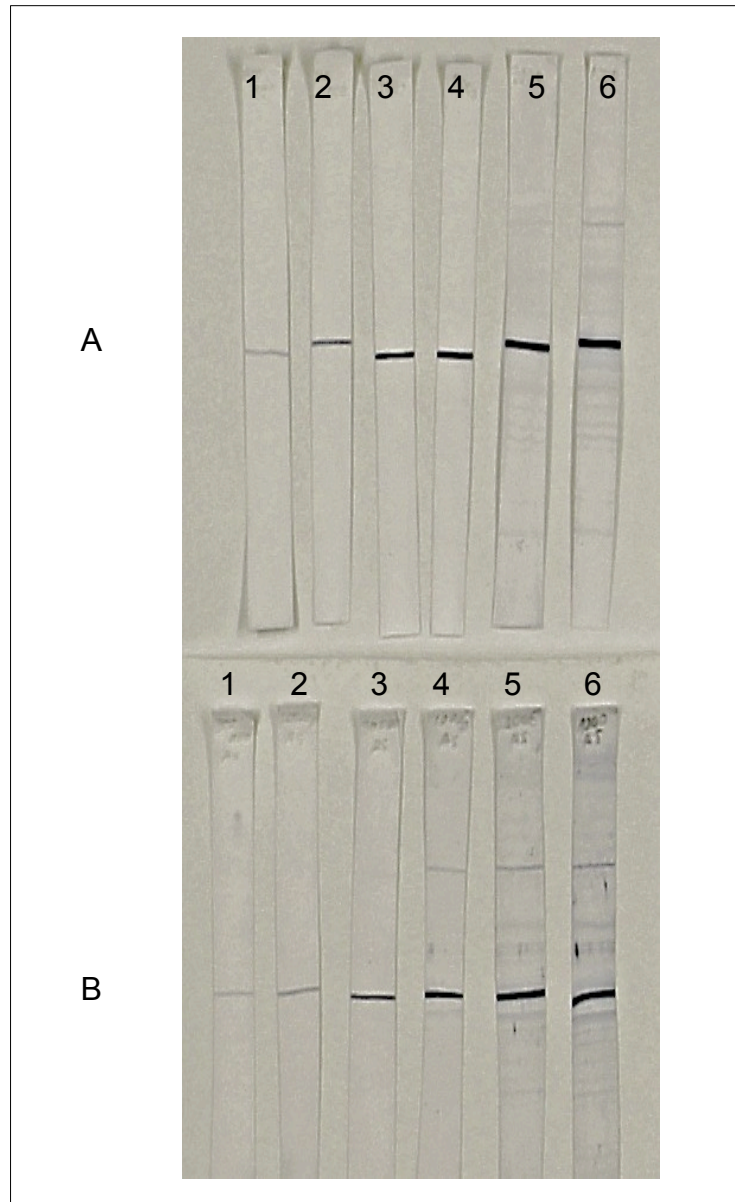
Tab. 4.3: Quantifizierung löslichen PBP2x-Derivats aus *E. coli* BL21

| Fraktion | Volumen | OD <sub>280</sub>     | finale Proteinkonzentration |
|----------|---------|-----------------------|-----------------------------|
| I        | 4 ml    | 0,189 (1:10 verdünnt) | 2,223 mg/ml                 |
| II       | 4 ml    | 0,613                 | 0,723 mg/ml                 |

Zur Detektion von PBP2x auf Western Blots wurde das PBP2x-Antiserum 1646/13 (Laible *et al.*, 1992) verwendet. Da es sich bei Antiseren um eine Mischung von Antikörpern im Blutserum des immunisierten Tiers, hier eines Kaninchens, handelt, können bei der Detektion komplexer Proteingemische Hintergrundbanden entstehen. Um dies zu vermeiden wurden die spezifischen Anti-PBP2x-Antikörper mittels Affinitätschromatographie über eine 1ml HiTrap NHS-PBP2x-Säule (GE-Healthcare) gereinigt.

In der ersten von drei Elutionsfraktionen (a 5,4 ml) wurden mittels OD<sub>280</sub> Antikörper in einer Konzentration von 267µg/ml nachgewiesen, wohingegen in den beiden nächsten Fraktionen kein Proteingehalt mehr detektiert werden konnten.

Ein Vergleich der Reaktivität der affinitätsgereinigten Antikörper mit dem ursprünglichen Antiserum ist in Abb. 4.19 dargestellt. Als Proteinprobe wurde hierfür *S. p.* R6-Lysat verwendet.



**Abb. 4.19:** Nachweis von PBP2x nach Western Blot. Als Probe wurde ein *S. pneumoniae* R6-Lysat verwendet. Der Blot wurde in Streifen geschnitten, die mit verschiedenen anti-PBP2x-Antikörpern behandelt wurden: (A) Affinitätsgereinigte Anti-PBP2x Antikörper; (B): Antiserum 1646/13 (B). Verdünnungen: 1 = 1:300.000; 2 = 1:100.000; 3 = 1:30.000; 4 = 1:10.000; 5 = 1:3.000; 6 = 1:1.000;

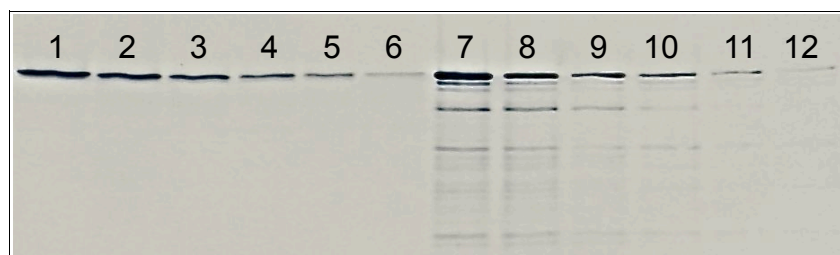
Beim Vergleich der beiden Antiseren zeigt sich, dass die affinitätsgereinigten Antikörper in dreifach geringerer Konzentration gleiche Bandenintensitäten lieferten wie das Ausgangsserum 1646. Darüber hinaus sind unspezifische Banden beim Rohserum deutlich stärker sichtbar.

Für nachfolgende Experimente wurde die affinitätsgereinigte Antikörperfraktion in einer Verdünnung von 1:30 000 zur Detektion von PBP2x eingesetzt.

Um einen Vergleich von Proteinmenge (PBP2x-Derivat) und Zellzahl (*S. p.* R6) zu ermöglichen wurde ein Lysat von *S. p.* R6 (N = 88,3) hergestellt, und die Lebendkeimzahl exakt bestimmt. Für die Probe ergab sich ein Titer von  $5,435 \times 10^8$  cfu/ml; das entspricht einer Lebendkeimzahl von  $1,209 \times 10^8$  cfu für die Standardprobe, die auf das SDS-Gel aufgetragen wurde. Zusätzlich wurden die Zellen der Kultur mikroskopisch ausgezählt, um über die durchschnittliche Kettenlänge der verwendeten Kultur einen Korrekturfaktor zu ermitteln (Zellen/cfu). Hierzu wurden 3 Kulturproben zwischen N 73-90 entnommen. Bei den 10 Bildausschnitten, die in allen drei Proben ausgewertet wurden, ergab sich eine durchschnittliche Kettenlänge von 2,343 Zellen bei im Durchschnitt 15 ausgewerteten Ketten pro Bildausschnitt. Der Großteil der Bakterien war, wie zu erwarten, in Form von Diplokokken vorzufinden. Daher ergibt sich eine Zellzahl für eine Standard-Gelprobe von  $2,833 \times 10^8$ .

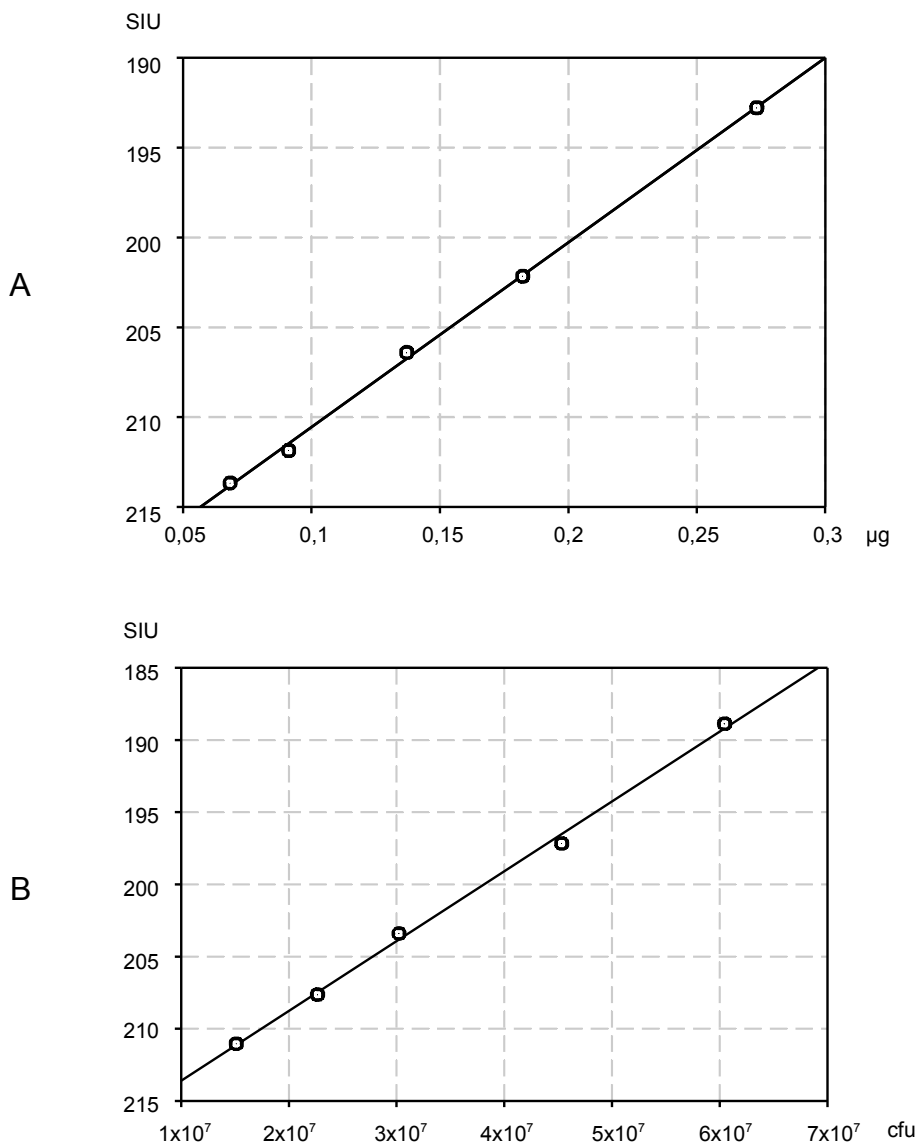
Für den Western Blot wurden als Standard definierte Mengen des löslichen PBP2x-Derivats auf ein Gel aufgetragen, zusammen mit dem *S. p.* R6-Zellysat.

Nach Western Blotting und Anfärben mittels affinitätsgereinigter Antikörper (Abb. 4.20) wurde die BPBP2x Menge bestimmt.



**Abb. 4.20:** Immunoblot von PBP2x<sub>sol.</sub> und *S. pneumoniae* R6-Lysat. Es wurden affinitätsgereinigte PBP2x-Antikörper verwendet (1 : 30000). PBP2x: 1 = 0,36µg; 2 = 0,27µg; 3 = 0,18µg; 4 = 0,14µg; 5 = 0,09µg; 6 = 0,07µg; *S. p.* R6-Lysat: 7 =  $1,1 \times 10^8$  cfu; 8 =  $5,5 \times 10^7$  cfu; 9 =  $4,13 \times 10^7$  cfu; 10 =  $2,75 \times 10^7$  cfu; 11 =  $2,06 \times 10^7$  cfu; 12 =  $1,38 \times 10^7$  cfu;

Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert und zum einen gegen die Lebendkeimzahl (Lysat) und zum anderen gegen die Proteinmenge (PBP2x-Derivat) aufgetragen (Abb. 4.21). Für beide Graphen wurde eine Regressionsgerade ermittelt.



**Abb. 4.21:** Auswertung der Westernblots zur Quantifizierung von PBP2x pro Zelle. A: PBP2x-Derivat [ $\mu\text{g}$ ]; B: Lebendkeimzahl [cfu]. [SIU]: Bandenintensität (Anmerkung: niedriger SIU-Wert = dunkle Bande im Blot) Die durchgezogene Linie markiert die Regressionsgerade.

Die Daten dieser beiden Bestimmungen, sowie die daraus resultierenden Werte für die Proteinmenge pro cfu sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.



Tab. 4.4: PBP2x Proteinmenge pro *S. p.* Zelle. Die Werte wurden über die Regressionsgeraden aus Abb. 4.21 ermittelt. Die grau hinterlegten Werte [ $\mu\text{g}$  oder cfu] repräsentieren die gemessenen Werte, aus denen im jeweils anderen Graph die Gegenwerte [ $\mu\text{g}$  oder cfu] abgelesen wurden.

| Lebendkeimzahl [cfu]   | Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] | $\mu\text{g}/\text{cfu}$ |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 6,05 x 10 <sup>7</sup> | 0,31                           | 5,14 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 4,53 x 10 <sup>7</sup> | 0,23                           | 5,07 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 3,02 x 10 <sup>7</sup> | 0,17                           | 5,61 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 2,26 x 10 <sup>7</sup> | 0,13                           | 5,66 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 1,51 x 10 <sup>7</sup> | 0,1                            | 6,31 x 10 <sup>-9</sup>  |

| Lebendkeimzahl [cfu]   | Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] | $\mu\text{g}/\text{cfu}$ |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 9,83 x 10 <sup>6</sup> | 0,07                           | 6,95 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 1,36 x 10 <sup>7</sup> | 0,09                           | 6,71 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 2,49 x 10 <sup>7</sup> | 0,14                           | 5,51 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 3,36 x 10 <sup>7</sup> | 0,18                           | 5,41 x 10 <sup>-9</sup>  |
| 5,30 x 10 <sup>6</sup> | 0,27                           | 5,16 x 10 <sup>-9</sup>  |

Zur Berechnung der Anzahl von PBP2x-Molekülen pro *S. p.* R6-Zelle liegen nun folgende Ausgangsdaten vor:

- 3 Aus Tab. 4.4 ergibt sich eine durchschnittliche PBP2x-Proteinkonzentration in *S. p.* R6 von  $5,756 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\text{cfu}$ .
- 4 Das Molekulargewicht des löslichen PBP2x-Derivats wurde anhand der Aminosäuresequenz auf  $79734,97 \text{ g/mol}$  bestimmt. Daraus ergibt sich, dass  $1 \mu\text{g}$  des Proteins  $12,524 \text{ pMol}$  entsprechen.
- 5 Die Avogadro-Konstante  $N_A$  (Teilchenzahl/Stoffmenge) beträgt  $6,0221415 \times 10^{23} \text{ 1/Mol}$ .

Eine cfu *S. p.* R6 enthält somit  $5,756 \times 10^{-9} \mu\text{g}$ , entsprechend  $7,219 \times 10^{-20} \text{ Mol}$ , entsprechend  $43475$  Moleküle PBP2x. Zusammen mit dem Korrekturfaktor  $2,3433$  Zellen/cfu ergibt sich somit eine Anzahl von  $18545$  Molekülen PBP2x pro Zelle.

Bisher in diesem Bereich gemachten Experimente ermittelten Werte von  $260 \pm 60$  Molekülen PBP2x pro cfu (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005). Somit liegen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte  $167$ -fach höher.

#### 4.4.2 Immunologische Analyse von PBP2a aus Labormutanten und klinischen Isolaten

In den unter 1.4 beschriebenen Cefotaxim-selektionierten Mutanten besitzen drei eine Mutation in *pbp2a*, das zu einem vorzeitigen Translations-Stop und somit evtl. zu einem verkürzten Genprodukt führt. Während bei der *in silico*-Translation von C403 nur ein Peptid mit einer Länge von 41 Aminosäuren verbleibt, könnte die Transglycosylase-Domäne von PBP2a in C406 (566 Aminosäuren) theoretisch intakt sein. Bei C604 endet das vermeintliche Protein nach 215 Aminosäuren. Zumindest in C406 könnte daher eine PBP2a-abhängige Transglycosylaseaktivität, d.h. eine Penicillin-unabhängige Enzymaktivität, vorhanden sein.

Es gibt klare Hinweise, dass PBP2a eine wichtige Rolle bei der Transglycosylierung in *S. pneumoniae* spielt. Deletionsmutanten von PBP2a können dargestellt werden, jedoch zeigen diese eine erhöhte Sensitivität gegen Moenomycin (Hoskins et al., 1999; Paik et al., 1999), einem Transglycosylase-ihibierenden Glycopeptid (Baizman et al., 2000). Darüber hinaus sind Mutanten, denen sowohl PBP2a, als auch das ebenfalls für die Transglycosylierung wichtige PBP1a, fehlt, nicht lebensfähig (Paik et al., 1999).

Verbleibt in den oben genannten C-Mutanten ein Rest-Protein und damit auch eine potentielle Transpeptidase- und/oder Transglycosylase-Aktivität oder wird das verkürzte Protein abgebaut? Eine Klärung dieser Frage könnte mit Hilfe von Anti-PBP2a Antikörpern erbracht werden. Dafür wurden zunächst zwei Derivate von PBP2a dargestellt und zur Gewinnung von Kaninchen-Antiseren eingesetzt. Die Antiseren wurden anschließend verwendet, um mögliche PBP2a-Derivate in Lysaten der Mutanten nachzuweisen.

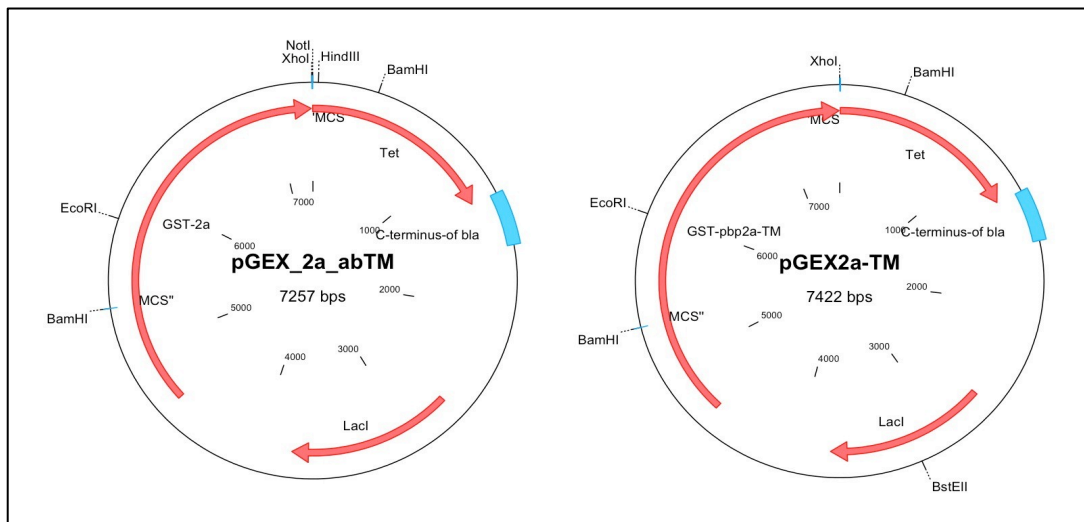
Die unter 4.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in PBP2a aus klinischen *S. mitis*-Isolaten Resistenz gegen  $\beta$ -Lactame vermitteln können. Zur Auswahl von Stämmen mit Veränderungen in PBP2 zur Erforschung dieses Effekts, stellen Bocillin-Bindungsstudien ein probates Mittel dar. Eine dazu ergänzende Methode könnte die Betrachtung der unterschiedlichen Bindungsintensitäten gegen PBP2a-Antikörper darstellen, die bereits mit monoklonalen Pbp1a- und 2b-Antikörpern durchgeführt wurde (Hakenbeck et al., 1991).

#### 4.4.3 Gewinnung von PBP2a-Antiseren

Die Aufreinigung eines PBP2a-Derivats wurde bereits beschrieben. Hierbei wurde ein Konstrukt verwendet, das ohne den N-terminalen Bereich vor der Transmembranregion und die Transmembran-Domäne exprimiert wurde (Zhao *et al.*, 1999). Analog hierzu wurde auf Basis des Vektors pGEX-6P-1-tet ein Plasmid zur Überexpression des extrazellulären Teiles von PBP2a dargestellt (PBP2a<sub>abTM</sub>). Zusätzlich wurde analog zum Plasmid pGEX-6P-1-tet<sub>2x-sol.</sub> ein Plasmid zur Überexpression von PBP2a ebenfalls ohne Transmembrandomäne, allerdings mit dem intrazellulären N-terminalen Bereich (PBP2a -TM ) kloniert.

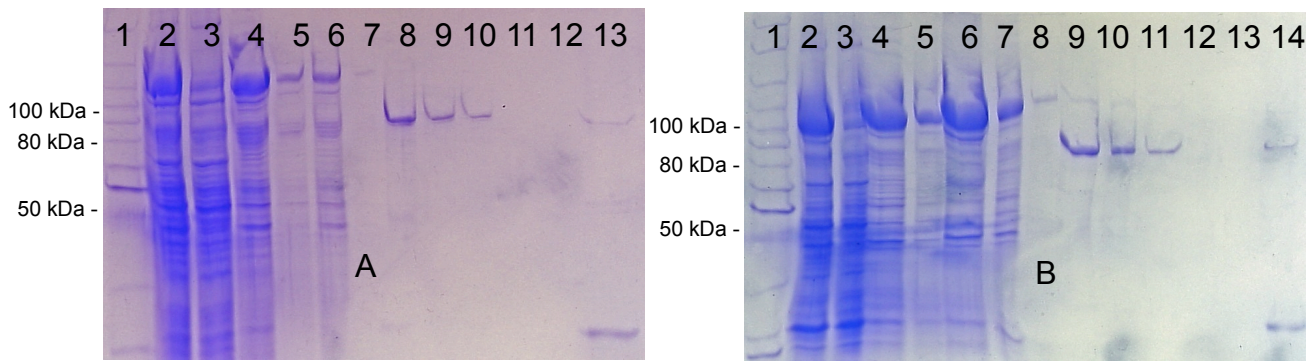
**Tab. 4.5:** Protokoll zur Darstellung der Plasmide ( pGEX-6P-1-tet<sub>2a<sub>ab</sub>TM</sub> und pGEX-6P-1-tet<sub>2a-TM</sub> ) zur Überexpression von *S. p.*- PBP2a-Derivaten in *E. coli*

|                             | PBP2a <sub>ab</sub> TM  | PBP2a -TM   |
|-----------------------------|---|---|
| 1. PCR                      | 2aTMf_BamH1/2aTAAr_Xho1 (aus <i>S. p.</i> R6): T <sub>234</sub> -T <sub>2195</sub>                              | 2aTMf_BamH1/2aTAAr_Xho1 (aus <i>S. p.</i> R6): T <sub>234</sub> -T <sub>2195</sub>  |
| 1. Restriktion              | 6 pGEX-6P-1-tet: 1x BamH1/BstE2; 1x Xho1/ BstE2<br>7 PCR ab TM: BamH1/Xho1                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• pGEX-6P-1-tet: 1x BamH1/BstE2; 1x Xho1/BstE2</li> <li>• 1. PCR: BamH1/Xho1</li> <li>• pBluescript KS+: BamH1/Xho1</li> </ul> |
| 1. Aufreinigung (präp. Gel) | 1. pGEX-6P-1-tet (2,1kb BstE2/BamH1)<br>2. pGEX-6P-1-tet (3,2kb Xho1/BstE2)<br>3. PCR: abTM (1921bp BamH1/Xho1) | 1. pBluescript KS+ (3kb BamH1/Xho1)<br>2. PCR: (2,2kb BamH1/Xho1)<br>3. pGEX-6P-1-tet (2,1kb BstE2/BamH1)<br>4. pGEX-6P-1-tet (3,2kb Xho1/BstE2)                      |
| 1. Ligation                 | Fragment 1. + 2. + 3.   | Fragment 1. + 2.  |
| 2. PCR                      | -   | 2aTMf/2aTMr (Plasmid aus 1. Ligation als Template-DNA)(5,2kb)   |
| 2. Aufreinigung (präp. Gel) | -   | 5,2kb Stück aus 2. PCR, anschließende Phosphorylierung  |
| 2. Ligation                 | -   | blunt end Ligation der 2. Aufreinigung  |
| 2. Restriktion              | -   | 2. Ligation: BamH1/Xho1   |
| 3. Aufreinigung             | -   | 5. Fragment 2a-TM 2136 bp   |
| 3. Ligation                 | -   | Fragment 3. + 4. + 5.   |



**Abb. 4.22:** Schematische Darstellung der Plasmide zur Überexpression von PBP2a-Derivaten in *E. coli*: pGEX-6P-1-tet<sub>2a\_ab</sub>TM (links) und pGEX-6P-1-tet<sub>2a</sub>-TM (rechts);

Die Aufreinigung der beiden PBP2a-Derivate erfolgte analog zur Aufreinigung des löslichen PBP2x Derivats. Da sich im Rahmen einer Test-Aufreinigung im kleinen Maßstab allerdings zeigte, dass bei den hier verwendeten PBP2a-Konstrukten, wie auch bei den bereits beschriebenen PBP2a-Überexpressionen (Zhao *et al.*, 1999), die Proteine in Einschlusskörpern vorliegen, wurde ein Solubilisierungsschritt eingefügt. Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.23).

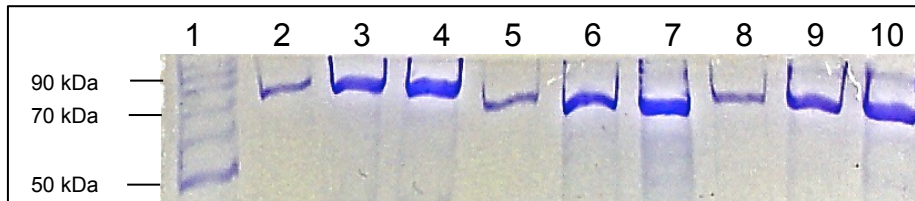


**Abb. 4.23:** Aufreinigung von rekombinanten PBP2a-Derivaten aus *E. coli* BL21. Die Mengenangaben beziehen sich auf die repräsentierte Kulturmenge (Ausnahme: Säulenmaterial). **A:** PBP2a-TM: 1 = Benchmark Protein Ladder (Invitrogen); 2 = Lysat ( $\triangleq$  0,3 ml Kultur); 3 = Cytoplasma-Fraktion ( $\triangleq$  0,31 ml); 4 = 1. Solubilisierung ( $\triangleq$  0,73ml); 5 = 2. Solubilisierung ( $\triangleq$  0,73ml); 6 = Durchfluss ( $\triangleq$  0,28 ml); 7 = Waschschrift; 8 = 1. Elution ( $\triangleq$  1,1 ml); 9 = 1. Elution ( $\triangleq$  0,44 ml); 10 = 2. Elution ( $\triangleq$  1,1 ml); 11&12 = leer; 13 = Säulenmaterial ( $\triangleq$  0,5 $\mu$ l).

**B:** PBP2a\_abTM: 1 = Benchmark Protein Ladder (Invitrogen); 2 = Lysat ( $\triangleq$  0,3 ml Kultur); 3 = Cytoplasma-Fraktion ( $\triangleq$  0,31 ml); 4 = 1. Solubilisierung ( $\triangleq$  0,73ml); 5 = 2. Solubilisierung ( $\triangleq$  0,73ml); 6 = Sediment ( $\triangleq$  0,3 ml); 7 = Durchfluss ( $\triangleq$  0,28 ml); 8 = Waschschrift; 9 = 1. Elution ( $\triangleq$  1,1 ml); 10 = 1. Elution ( $\triangleq$  0,44 ml); 11 = 2. Elution ( $\triangleq$  1,1 ml); 12&13 = leer; 14 = Säulenmaterial ( $\triangleq$  0,5 $\mu$ l); Die Größe der Banden des Längenstandards ist jeweils auf der rechten Seite angegeben.

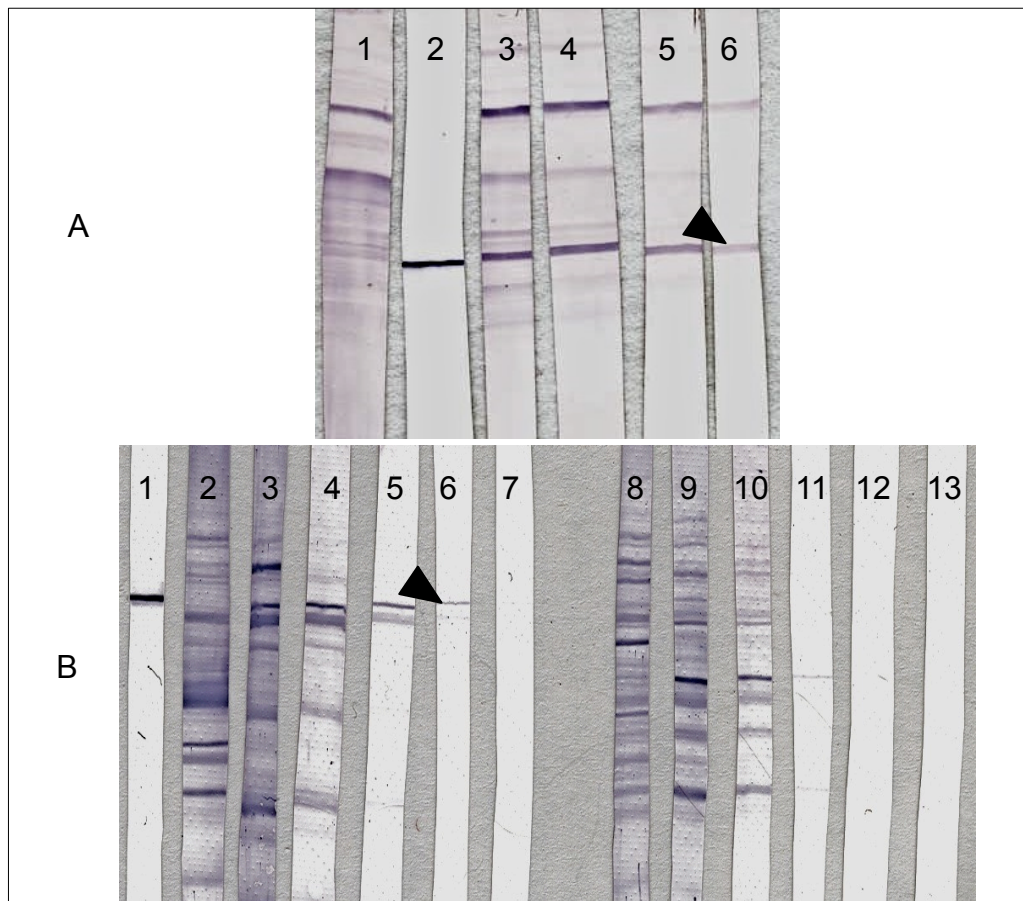
Beide Konstrukte lieferten das gewünschte Fusionsprotein, wobei dies in beiden Fällen nur in sehr geringen Mengen in der Cytoplasma-Fraktion zu finden ist. Die Solubilisierung des Lysat-Sediments lieferte jedoch lösliche GST-PBP2a-Derivate, welche an GSH-Sepharose immobilisiert werden konnten. Nach der Abspaltung der PBP2a-Derivate vom immobilisierten GST wurden diese eluiert, wobei jedoch mehr PBP2a-TM als PBP2a\_abTM erhalten wurden. Während die Ausbeute aus 1,1l *E. coli* Kultur (in Elutionsfraktion 1) für PBP2a-TM bei 2,45 mg lag, konnten 4 mg von PBP2a\_abTM aus der gleichen Kulturmenge isoliert werden.

Für die Antikörpergewinnung wurden die Proteine mit Aceton gefällt und als Sediment an die Firma SeqLab versandt. Hierzu wurden 2259 $\mu$ l Elutionsfraktion 1 von PBP2a\_abTM und 1565 $\mu$ l Elutionsfraktion 1 von PBP2a\_abTM eingesetzt. Die Fällung erfolgte aufgeteilt in sechs (PBP2a\_abTM) bzw, elf (PBP2a\_abTM) Eppendorfgefäßen. Bei jeweils einem Eppendorfgefäß wurde das Sediment in SDS-Probenpuffer gelöst und so der Erfolg der Fällung über SDS\_PAGE und Coomassiefärbung überprüft (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24:** Quantifizierung gereinigter PBP2a-Derivate. Fraktionen von PBP2a -TM und PBP2a\_abTM, die nach GSH-Sepharose und anschließender Elution erhalten wurden, wurden gesammelt und mit Aceton gefällt. Die Sedimente wurden in entsprechenden Mengen SDS-Probenpuffer resuspendiert (Endkonzentration 1µg/µl), und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet. Proben: 1 = Längenstandard; 2 - 4 = 1µg, 3µg und 5µg PBP2a -TM; 5 - 7 = 1µg, 3µg und 5µg BSA; 8 - 9 = 1µg, 3µg und 5µg PBP2a\_abTM. Die Größe der Banden des Längenstandards ist auf der linken Seite angegeben.

Die Bandenintensitäten der PBP2a-Derivate entsprechen denen der zum Vergleich eingesetzten BSA-Proben. Somit waren die Acetonfällungen erfolgreich. Die PBP2a-TM und PBP2a\_abTM enthaltenden Sedimente wurden zur Gewinnung von Kaninchen-Antiseren eingesetzt. Die Proben der ersten und zweiten Blutung sowie des Präimmunserums wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf Western Blots mit *S. pneumoniae* R6-Lysat getestet (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25:** Spezifität der Antiseren gegen PBP2a\_abTM (6120) und PBP2a-TM (6121). Eingesetzt wurden die Antiseren, die nach der 1. und 2. Blutung erhalten worden waren. Als Probe wurde ein R6-Lysat nach SDS-PAGE und Western Blot verwendet.

**A:** 1 = anti-PBP2a\_abTM Präimmunsereum; 2 = affinitätsgereinigtes PBP2x-Antiserum (Kontrolle); 3-7 = Verdünnungen von anti-PBP2a\_abTM 1. Blutung: 1:300, 1:1000, 1:3000, 1:10000; **B:** 1 = affinitätsgereinigtes PBP2x-Antiserum (Kontrolle); 2 = anti-PBP2a\_abTM Präimmunsereum; 3-7 = Verdünnungen von anti-PBP2a\_abTM 2. Blutung: 1:333, 1:1000, 1:3330, 1:10000, 1:33300; 8 = anti-PBP2a-TM Präimmunsereum; 9-13 = Verdünnungen von anti-PBP2a\_abTM 2. Blutung: 1:333, 1:1000, 1:3330, 1:10000, 1:33300;

Antiserum 6121 (-TM) zeigt beim Test auf *S. pneumoniae*-R6-Lysaten sowohl bei der ersten (kein Bild) als auch bei der zweiten Blutung (Abb 2.25 A) keine spezifischen Banden in Höhe der von PBP2x (Kontrolle), wo PBP2a laufen sollte.

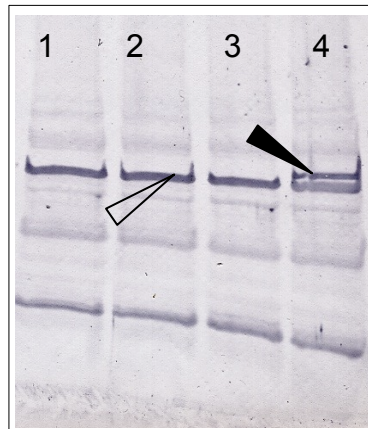
Mit Antiserum 6120 (ab\_TM) konnte beim Test der ersten und zweiten Blutung eine spezifische Bande im Bereich von PBP2x (Kontrolle) nachgewiesen werden, die bei der zweiten Blutung bis zu einer Verdünnung von 1:3330 zu erkennen ist. Für künftige Versuche wurde eine Verdünnung des Antiserums von 1:2000 gewählt.

Knapp unterhalb der PBP2a-Bande ist auch bei höheren Verdünnungen eine unspezifische Bande zu erkennen, die unabhängig von PBP2a auftritt (s. folgende Abschnitte).



#### 4.4.4 Western Blot Analyse von C-Mutanten mit PBP2a-Mutation

Das überprüfte Antiserum 6120 wurde in eine Western-Blot-Analyse der Lysate von C-Mutanten mit PBP2a-Mutationen eingesetzt (Abb. 4.26)



**Abb. 4.26:** PBP2a in Cefotaxim-resistenten Labormutanten von *S. pneumoniae*. Western-Blot ( $\alpha$ -PBP2a<sub>ab</sub> TM, 1:2000) von Lysaten Cefotaxim-selektionierter *S. pneumoniae*-Labormutanten: 1 = *S.p.* C604; 2 = *S.p.* C406; 3 = *S.p.* C403; 4 = *S.p.* R6 (Kontrolle); Die PBP2a-Bande bei R6 ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die unspezifische Bande unterhalb von PBP2a ist mit einem offenen Pfeil bezeichnet.

In *S. pneumoniae* R6 ist die PBP2a-spezifische Bande deutlich erkennbar, die leicht oberhalb der unspezifischen Bande liegt. Die Proben aller 3 untersuchten C-Mutanten zeigen nur die unspezifische Bande, während kein Protein auf der Höhe von PBP2a nachweisbar ist. Auch unterhalb dieses Bereiches sind keine von der R6-Probe abweichenden Banden zu finden, was vermuten lässt, dass keine verkürzten PBP2a-Derivate in den Mutanten produziert werden.

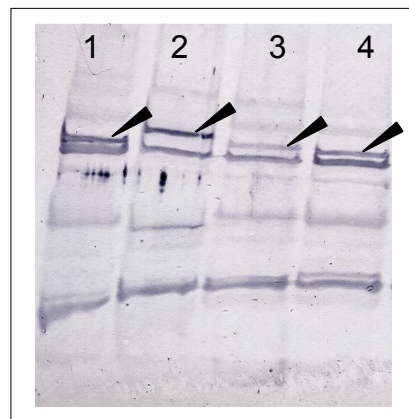
#### 4.4.5 Western-Blot-Analyse von PBP2a aus klinischen Streptokokken-Isolaten

Untersuchungen der unterschiedlichen Affinität gegen PBP-Antiseren stellen neben der DNA-Sequenzierung eine weitere Möglichkeit dar, klinische Streptokokken-Stämme voneinander zu unterscheiden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Vergleich von PBP-Profilen und Affinität gegen Antiseren sowie monoklonale Antikörper gegen PBP1a und 2b unterschiedliche klonale Gruppen von *S. pneumoniae*-Stämmen gegeneinander abgegrenzt werden können (Hakenbeck et al., 1991). Unterschiedliche Affinitäten gegen PBP2a-Antiseren könnten dieses Bild präzisieren.



Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass bei vielen hochresistenten *S. pneumoniae*-Isolaten zwei Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums von PBP2a auftreten. Diese Mutationen (T411>A- und Q431>L) führen zu Veränderungen im Laufverhalten der PBP2a Banden: Isolate, die diese Mutationen tragen zeichnen sich durch ein PBP2a mit geringerer Mobilität in SDS-Gelen aus (siehe 4.2.3).

Vier klinische Isolate, von denen die PBP2a-Sequenz bekannt war, wurden ausgewählt, um die Aktivität des Antiserums zu überprüfen: *S. pneumoniae* R6 als Kontrolle (penicillin-sensitiv und Ursprung des Antigens) und die  $\beta$ -Lactam-resistenten Stämme *S. oralis* Uo5 (PBP2a 8,8% Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu R6), *S. mitis* B6 (3,1% Unterschiede) sowie *S. pneumoniae* 2349 (0,4 % Unterschiede).



**Abb. 4.27:** PBP2a in verschiedenen Streptokokken-Stämmen. Das PBP2a Protein wurde nach SDS-PAGE der Zelllysate auf einen Western-Blot übertragen, und mit anti-PBP2a Antiserum ( $\alpha$ -PBP2a<sub>ab</sub> TM, 1:2000) angefärbt. 1 = *S. pneumoniae* R6; 2 = *S. oralis* Uo5; 3 = *S. mitis* B6; 4 = *S. pneumoniae* 2349; Die PBP2a-Banden sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.

PBP2a konnte in allen vier analysierten Stämmen markiert werden. Die Banden unterscheiden sich allerdings sowohl in der Intensität als auch in der zurückgelegten Laufstrecke. Letzteres lässt sich durch die unspezifische Bande unterhalb von PBP2a, die in allen Zelllysaten auf derselben Höhe im Blot erkennbar ist, sehr gut detektieren. Während PBP2a von *S. p.* 2349 im SDS-Gel auf der selben Höhe wie PBP2a von *S. p.* R6 läuft, erscheinen die PBP2a-Banden sowohl von *S. mitis* B6, und besonders von *S. oralis* Uo5 nach oben verschoben. Bei *S. mitis* B6 kann PBP2a wurde weniger intensiv mit dem Antiserum markiert. Hingegen ist PBP2a von *S. oralis* Uo5 ähnlich stark markiert wie das Protein in *S. p.* R6.

Die schwächere Markierung des *S. mitis* B6 PBP2a könnte auf die Unterschiede in der AS-Sequenz im Vergleich zum R6-Protein zurückzuführen sein (Abb. 4.28). Allerdings ist das Uo5-PBP2a, das sich noch mehr von dem R6-Protein unterscheidet, genauso gut durch die Antikörper markiert wie R6. Zum Nachweis, welche Aminosäureveränderungen dafür verantwortlich sind wären weitere Versuche (z.B. mit verkürzten Peptiden) notwendig.

Die Proteine von *S. p.* R6, 2349 und *S. oralis* Uo5 weisen eine Länge von 732 Aminosäuren (AS) auf. Bei *S. mitis* B6 ist PBP2a, wie schon unter 4.2.1 erwähnt 734 AS lang.

```

000000000000000111112222222222333333333334444444444555566666666666666677777777
122222444556677225993335567899024555668899134445677880234703447778888889999000122333
9123890188968162812812378896041390595769031103441694865566136724812456891237147267123
S._p._R6       SLEDILAQFILGLIVNIVSEEVSEDNETHILIVSRFQQDNTTQDKVRSDVEKSEATEANIAARQTDNSTDNLGSDSDIVR
S._p._2349    -----K-----N--A-----N-----
S._m._B6     -S--S-GHVV-S-T--V-TDA--Q-----V-A-----AL--L-A-----KDT-----V-GNF
S._o._Uo5    NSAESMGH-VI-ITIDVLT-QLT-T-KGAQVIVIAIHERGDP--NQ-PAEIDRGGTK---SMEEKVEETNSEPIGSN-GE-L-

```

**Abb. 4.28:** Komprimiertes Alignment der PBP2a-Sequenzen von *S. pneumoniae* R6, *S. mitis* B6 und *S. oralis* Uo5. Nur die Positionen, bei denen in einem Vergleichsstamm Abweichungen von der Sequenz von *S. p.* R6 auftreten, sind gezeigt. Aminosäuren, die der Sequenz von *S. p.* R6 entsprechen sind durch (-) ersetzt.

## 5. Diskussion

### **5.1 Deletion von *pbp2a*: Auswirkungen auf Cefotaxim-Resistenz**

Ausgangspunkt für die Experimente mit dem *pbp2a*-Allel von C403 war die Tatsache, dass beim Vergleich der Cefotaxim-MHK von C303 und C403 ein ungewöhnlich hoher Unterschied festzustellen und dieser scheinbar auf die Mutation im *pbp2a*-Allel und dem daraus resultierenden vorzeitigen Translations-Stop zurückzuführen ist (van der Linden, unveröffentlichte Ergebnisse).

Sowohl die Art der Mutation, die Wiederholung eines 8bp langen Sequenzabschnitts, als auch die daraus resultierende Konsequenz, nämlich der Verlust eines Target-Proteins, sind zwei Phänomene, die bei der Entwicklung von Antibiotika-Resistenz bisher weder im Labor noch in der Klinik beschrieben wurden. Ein vorzeitiger Translations-Stop tritt auch bei den beiden anderen mit Cefotaxim selektionierten *pbp2a*-Mutationen auf, wobei einer davon, in C406, ebenfalls durch eine Sequenzwiederholung hervorgerufen wird (van der Linden, unveröffentlichte Ergebnisse).

Zur Darstellung von C303-Mutanten mit inaktiviertem PBP2a wurde bereits in zurückliegenden Experimenten *pbp2a* im C303-Hintergrund mit Hilfe der Insertions-Duplikations-Mutagenese (IDM) inaktiviert. Die so erhaltenen Mutanten zeigen eine MHK von 0,5 µg/ml Cefotaxim. Dies bedeutet einen Anstieg verglichen mit 0,3 µg/ml bei C303, entspricht jedoch nicht den bei C403 gemessenen 1,1 µg/ml. Somit kann die Inaktivierung von PBP2a nicht, zumindest nicht alleine, für die hohe MHK von C403 verantwortlich sein. Des weiteren ist nicht auszuschließen, dass das im Rahmen der IDM ins Genom integrierte Plasmid oder der dadurch nötige Selektionsdruck mit Erythromycin die Ergebnisse der Experimente beeinflussen.

Zum Ausschluss solcher Effekte sollte eine Deletion von *pbp2a* in C303 auf anderem Wege erreicht werden. Daher wurde zunächst das *pbp2a*-Allel von C403 direkt in C303 transformiert, wobei ein 3,4 kb PCR Produkt verwendet wurde, das große *pbp2a*<sub>C403</sub>-flankierende Bereiche enthielt, die eine homologe Rekombination garantieren sollten. Die im ersten Ansatz gewählte Transformation mit Cefotaxim-Selektion lieferte Transformanten, die das mutierte Gen aufgenommen hatten. Somit wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von PBP2a eine Rolle bei der Cefotaxim-Resistenz spielt.

Bei der Selektion von Cefotaxim-resistenten Labor-Mutanten treten neben Mutationen in PBP2a auch Veränderungen in der Histidinkinase CiaH des signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-Systems CiaRH auf (Guenzi *et al.*, 1994). Mutationen in *ciaH* wurden seitdem häufig in Transformanten nach der Übertragung von *pbp2x* oder *pbp1a* unter Cefotaxim-Selektion gefunden (AG Hakenbeck, unveröffentlichte Daten). Daher wurde in den mit diesem Antibiotikum selektionierten *pbp2a*-Transformanten *ciaH* sequenziert. In 3 der 8 überprüften *pbp2a*-Transformanten konnten tatsächlich solche Mutationen gefunden werden. Es ist nicht auszuschließen, daß durch die Selektion mit Cefotaxim weitere Mutationen in anderen Loci selektioniert werden können, die die Resistenz möglicherweise beeinflussen. Daher wurde in einem zweiten methodischen Ansatz eine Strategie zur Deletion von *pbp2a* gewählt, in der kein  $\beta$ -Lactam zur Selektion verwendet wurde. Es wurde die sogenannte Janus-Kassette eingesetzt. Diese ermöglicht das Einfügen eines mutierten Genabschnitts durch negative Selektion (Sung *et al.*, 2001); allerdings ist es notwendig zunächst ein Streptomycin-resistentes Derivat zu isolieren, in dem anschließend das gewünschte Allel, hier *pbp2a*<sub>C403</sub>, eingebracht werden soll.

Die mittels dieser Methode dargestellte Mutante C303<sub>*pbp2a*C403</sub> weist eine leicht erhöhte MHK im Vergleich zum Ausgangsstamm auf (0,35  $\mu$ g/ml vs. 0,3  $\mu$ g/ml). Somit ist gezeigt, dass die Inaktivierung von PBP2a in C303 durch Transformation des *pbp2a*-Allels von C403 eine Erhöhung der Resistenz gegen Cefotaxim bewirkt. Diese ist aber nur gering und erreicht nicht annähernd das Niveau von C403. Ergo muss es in C403 mindestens einen weiteren Faktor geben, der für die Resistenz verantwortlich ist.

In der Labormutante C303, in der Punktmutationen sowohl in *pbp2x* als auch in *ciaH* vorhanden sind, beeinflusst der Verlust von PBP2a also die MHK gegen Cefotaxim. Im Gegensatz dazu treten in resistenten klinischen Isolaten keine Mutanten mit einzelnen Punktmutationen in *pbp2x* auf, sondern das Gen besitzt eine Mosaikstruktur aufgrund von Gentransfer-Ereignissen (Laible *et al.*, 1991). Des Weiteren wurden bisher in klinischen Isolaten keine *ciaH*-Mutationen beschrieben.

Um zu sehen, ob die Inaktivierung von PBP2a auch in Gegenwart von Mosaik-PBP2x Genen zur Resistenz beiträgt, wurde *pbp2x* des *S. pneumoniae*-Stammes 2349 gewählt, das zu einer weit verbreiteten Familie von Mosaik-PBP2x-Genen gehört. Tatsächlich führte die *pbp2a*-Deletion in R6<sub>2x2349</sub> zu einer leichten Erhöhung des Resistenzniveaus.

Allerdings ist zu bedenken, dass der Stamm R6<sub>2x2349</sub> unter Cefotaxim-Selektion generiert wurde. Eine Mutation in *ciaH* liegt zwar nicht vor, aber das Risiko unbekannter Mutationen besteht. Hierfür spricht auch die ungewöhnlich hohe MHK für einen Stamm mit lediglich einem veränderten PBP2x.

Die *pbp2a*<sub>C403</sub>-Mutation im Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 führt zu deutlichen Defiziten im Wachstum der Mutante im Vergleich zum Parentalstamm R6. Diese Ergebnisse bestätigen Daten von PBP2a-Mutanten, die durch IDM generiert worden waren (Paik et al., 1999). Das bedeutet auch, dass die damals dokumentierten Defizite nicht durch die eingebauten Resistenzkassetten beeinflusst oder verstärkt wurden. Andere Experimente, in denen keine Auswirkungen einer PBP2a-Inaktivierung auf die Wachstumsrate festgestellt wurden (Hoskins et al., 1999), konnten demnach nicht bestätigt werden. Diese Unterschiede könnten in den unterschiedlichen Medien begründet sein, welche bei den Experimenten eingesetzt wurden. Parallelversuche mit Todd-Hewitt- und C-Medium könnten hierüber Klarheit verschaffen.

## 5.2 *pbp2a*-Allele aus klinischen Streptokokken-Isolaten

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt findet man in  $\beta$ -Lactam-resistenten, klinischen Streptokokken-Isolaten keine *pbp2x*-Allele mit einzelnen Punktmutationen (Sibold et al., 1994). Die PBP2x-Aminosäuresequenzen dieser Stämme zeigen deutliche Abweichungen bis (ca. 20 % auf DNA Ebene) zum Wildtyp. Für PBP2a sind bisher nur wenige Sequenzvergleiche durchgeführt worden. Die Frage ob auch im Fall von PBP2a Mosaikgene übertragen werden, wird in den bisher publizierten Arbeiten unterschiedlich beantwortet: Du Plessis et al., 2000 sehen keinen derartigen Zusammenhang, Chesnel et al., 2005 sehen zumindest die Möglichkeit eines Vorkommens von Mosaikgenen im Fall von PBP2a. Zu beachten ist dabei, dass die *pbp2a*-Sequenzen wesentlich ähnlicher zueinander sind (ca. 5 % Unterschied auf DNA Ebene) als es bei den Mosaikgenen von *pbp2x* oder *pbp1a* der Fall ist.

Für die vorliegende Arbeit wurden 26 PBP2a-Sequenzen verglichen, die aus abteilungsinternen und aus öffentlichen Datenbanken stammen, und zum Teil im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden. In 11 davon, die vornehmlich aus hochresistenten Isolaten stammten, fand sich eine Mutation des Threonin an Position 411 zu einem Alanin. Diese Mutation befindet sich direkt neben dem aktiven Serin der

Penicillin-Bindungsdomäne und wurde bereits mit Cefotaxim-Resistenz assoziiert (Sanbongi *et al.*, 2004). Sie stellt das Analogon zu der bereits für PBP2x beschriebenen Mutation T<sub>338</sub>>A dar (Zerfass *et al.*, 2009). In allen analysierten Sequenzen ist der Austausch T<sub>411</sub>>A an das Vorkommen einer zweiten Mutation gekoppelt. Diese befindet sich an Position 431 und zeigt einen Austausch von Glutamin zu Leucin.

Ein Teil der analysierten Sequenzen stammte von polnischen Isolaten, die im Rahmen einer Kooperation mit dem National Medicines Institute (Warschau, Polen) untersucht wurden. Alle polnischen Isolate, die die beiden erwähnten Mutationen in PBP2a trugen, gehörten zum Serotyp 23F, während solche des Serotyps 6B diese Mutationen nicht trugen. Außerdem weisen die 6B-Stämme durchweg niedrigere Resistenzniveaus auf (Idzelsky *et al.*, 2007).

Auch der hoch-resistente *S. mitis*-Stamm B6 besitzt ein PBP2a, das die beiden Mutationen T<sub>411</sub>>A und Q<sub>431</sub>>L trägt. Darüber hinaus fiel eine Verlängerung des Proteins um 2 Aminosäuren auf. Die Sequenzdaten, welche aus der zwischenzeitlich publizierten Genom-Analyse (Denapate *et al.*, 2010) dieses Kommensalen stammen, zeigten die Ursache dieser Verlängerung: ein IS Element ist im 3'-Ende des Gens zu finden. Die Beeinträchtigung von PBPs durch das Auftreten eines IS-Elements wurde bisher noch nicht beschrieben. Zwar existieren Daten die IS-Elemente stromabwärts von *pbp2a* beschreiben, jedoch liegen diese alle außerhalb des Leserasters (Sanbongi *et al.*, 2004).

Zur experimentellen Betrachtung der Auswirkungen von niederaffinen PBP2a-Varianten aus klinischen Isolaten wurde das gleiche System gewählt wie anfangs beschrieben für die Deletionsderivate von *pbp2a*: Mit Hilfe der Janus-Kassette wurde das *pbp2a*-Allel von *S. mitis* B6 in unterschiedliche genetische Hintergründe transformiert. Das Gen *pbp2a*<sub>B6</sub> wurde aus mehreren Gründen hierzu ausgewählt:

- Es kodiert für ein niederaffines PBP2a
- Es beinhaltet die Mutationen T<sub>411</sub>>A und Q<sub>431</sub>>L
- Es sind R6-Transformanten beschrieben, die B6<sub>*pbp2a*</sub> neben B6<sub>*pbp2x*</sub> enthalten, wobei chromosomale DNA und CTX-Selektion verwendet wurden (Hakenbeck *et al.*, 1998)

Die Transformation von *pbp2a<sub>B6</sub>* in C303 führte zu einem ebenso leichten Anstieg in der MHK von 0,3 auf 0,35 µg CTX/ml wie die Inaktivierung mittels eingefügtem *pbp2a<sub>C403</sub>*-Allel. Kombiniert man allerdings *pbp2a<sub>B6</sub>* mit *pbp2x<sub>2349</sub>*, so steigt die MHK auf über das Doppelte im Vergleich zum Rezipienten R6<sub>*pbp2x2349*</sub>, nämlich auf 0,65µg CTX/ml an. Dies geschieht allerdings nur in der Transformante, in der der transformierte Bereich alle drei konservierten Motive der Transpeptidase-Domäne (SAIK, SLN und KTG) von PBP2a umfaßt. In einer anderen Mutante, in der nur das SAIK und das SLN-Motiv übertragen wurde, die also die zwei oben erwähnten Mutationen T<sub>411</sub>A und Q<sub>431</sub>L enthält, kam es nicht nur zu keinem Anstieg der MHK, sondern es wurde sogar ein leichter Abfall von 0,3 auf 0,25 µg/ml CTX verzeichnet. Das bedeutet, dass nicht nur die Mutationen in der Nähe des aktiven Serins, sondern auch solche, die im C-terminalen Bereich der Transpeptidase-Domäne zu finden sind, einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben: S<sub>461</sub>>A, T<sub>576</sub>>K, E<sub>601</sub>>D, und A<sub>633</sub>>T. Da die Mutation S<sub>461</sub>>A auch im Falle eines sensitiven *S. mitis* NCTC10712 auftrat ist deren Beteiligung an Resistenz unwahrscheinlich. Ob alle oder nur einige der anderen drei Mutationen eine Rolle spielen müssen weitere Mutationsanalysen belegen. Tatsächlich ist die T<sub>576</sub>>K Mutation in drei resistenten *S. pneumoniae*-Isolaten zu finden, in einem polnischen Isolat (k-598) sogar beide Mutationen T<sub>576</sub>>K und E<sub>601</sub>>D (siehe Abb. 4.9).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein niederaffines PBP2a unter gewissen Voraussetzungen, hier ein niederaffines PBP2x klinischen Ursprungs, einen deutlichen Einfluss auf das Resistenzniveau von *S. pneumoniae* gegen Cefotaxim hat. Bisher konnte mittels Cefotaximselektion lediglich die Übertragung eines für ein niederaffines PBP2a codierenden Gens aus chromosomaler DNA des *S. mitis* B6 Stammes gezeigt werden (Hakenbeck *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen eines niederaffinen PBP2a auf das Wachstum von *S. pneumoniae* untersucht. Der Wachstumsverlauf einer R6<sub>*pbp2aB6*</sub> Transformante von *S. pneumoniae* R6, welche die Transpeptidase-Domäne von *S. mitis* B6 trägt, aber sonst keine weiteren Mutationen aufweist, wurde hierzu analysiert. Wie bei den PBP2a-K.O.-Mutanten zeigt sich eine deutliche Verlängerung der Generationszeit. Allerdings zeigt R6<sub>*pbp2aB6*</sub> anschließend, im Gegensatz zur K.O.-Mutante, eine deutlich ausgeprägte stationäre Phase, die länger anhält als bei *S. pneumoniae* R6 (222 min gegenüber 178 min) . Für *S. pneumoniae* macht es also einen deutlichen Unterschied, ob

PBP2a ausgeschaltet wird, oder ob eine niederaffine PBP2a-Variante exprimiert wird. Dieser Unterschied zeigt sich sowohl bei der Resistenzentwicklung als auch bei der physiologischen Fitness.

### 5.3 Die Mutationen T411>A und Q431>L

Im Zug der Analyse niederaffiner PBP2a-Varianten in resistenten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* trat besonders häufig die Mutation T<sub>411</sub>>A, direkt nach den aktiven Serin (Position 410), auf. Diese Abweichung vom Wildtyp ist stets mit einer zweiten Mutation gekoppelt Glutamin<sub>431</sub> zu Leucin.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die physiologischen Auswirkungen dieser beiden Mutationen auf PBP2a untersucht werden. Hierzu wurden Transformanten von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6<sub>pbp2x2349</sub> dargestellt, die die Mutationen T<sub>411</sub>>A, beziehungsweise T<sub>411</sub>>A und Q<sub>431</sub>>L tragen.

Wie zu erwarten zeigten die Mutationen keinen Einfluss auf die Cefotaxim-Resistenz. Wie schon bei der Transformation von *S. p.* R6<sub>pbp2x2349</sub> mit dem *pbp2a*-Allel von *S. mitis* B6 zu sehen, sind offenbar (noch) andere Mutationen notwendig, um eine Erhöhung der Resistenz zu vermitteln. Ob die Empfindlichkeit gegenüber anderen  $\beta$ -Lactamen - Penicillinen wie z.B. Oxacillin - ebenfalls nicht tangiert wird müsste in zukünftigen Experimenten noch getestet werden.

Erstaunlich war daher, dass Transformanten mit der T<sub>411</sub>>A-Mutation in PBP-Bindungsstudien eine deutlich niedrigere Affinität von PBP2a zu Bocillin aufwiesen als der Wildtyp. Zur Darstellung dieses Unterschiedes wurden Mutanten und Wildtyp in einer bindungskinetischen Analyse verglichen: Das mutierte PBP2a bindet erst nach 4 Minuten die Bocillin-Menge, die an den Wildtyp binnen einer Minute gekoppelt wird. Diese deutlich geringere Affinität ist wohl der direkten Nachbarschaft der Mutation zum aktiven Serin<sub>410</sub> geschuldet. Die kovalente Bindung des Bocillin an diese Aminosäure wird durch die Ladungs- und Größenänderung an Position 411 beeinflusst. Ein analoger Austausch wurde für PBP2x beschrieben (Zerfass *et al.*, 2009). Auch dort wird Thr<sub>338</sub> direkt neben dem aktiven Ser<sub>337</sub> präferentiell durch ein Alanin, aber auch Prolin oder Glycin ersetzt; in diesem Fall wurde jedoch nicht nur eine Affinitätserniedrigung, sondern auch ein Effekt auf die  $\beta$ -Lactam-Resistenz detektiert.

Durch die zusätzlich eingefügte Mutation Q<sub>431</sub>>L verändert sich das Laufverhalten von



PBP2a bei der Elektrophorese. Da PBP2a und PBP2x bei dieser Mutante nahezu auf gleicher Höhe laufen, ist hier eine Quantifizierung der Bocillin-Bindung nicht möglich. Die optische Abschätzung bei unter optimalen Bedingungen gelaufenen Gelen lässt allerdings die Schlußfolgerung zu, dass durch die zweite Mutation die Affinität nicht oder nur sehr wenig herabgesetzt wird.

Die Verschiebung von PBP2a im SDS-Gel durch diese Mutation und die Tatsache dass die beiden analysierten Mutationen in klinischen Isolaten stets gemeinsam auftreten, könnten für eine schnelle Auswahl potentiell interessanter Stämme mit niederaffinem PBP2a ausgenutzt werden. Des weiteren zeigt die isolierte Betrachtung der beiden Mutationen im Wildtyp, dass die Verschiebung der PBP2a-Bande bei *S. mitis* B6 nicht (nur) der IS-bedingten Verlängerung der Aminosäure-Sequenz (Denapaite *et al.*, 2010) geschuldet ist. Die Untersuchung der punktmutierten PBP2a-Varianten zeigt, dass bereits ein einzelner Austausch großen Einfluss auf die Affinität des Proteins zu  $\beta$ -Lactamen haben kann, dessen Bedeutung für Cefotaxim-Resistenz jedoch eher sekundär ist. Hierzu sind mehrere Austausche über die gesamte Transpeptidase-Domäne, die man je nach Definition als Mosaic-Blöcke bezeichnen könnte, von Nöten.

## 5.4 PBP2a und CiaRH

Mutationen in PBP2x führen zu keiner großen Veränderung im Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae*, unabhängig davon ob es sich bei dem mutierten Allel um ein Mosaikgen klinischen Ursprungs handelt oder Punktmutationen aus Labormutanten vorliegen (Mascher *et al.*, 2006). Schaltet man in derartigen Mutanten jedoch das Zweikomponenten-System CiaRH aus, so zeigen sich deutliche Wachstumsdefizite. Ein funktionierendes CiaRH-System ist also wichtig beim Auftreten von PBP2x-Mutationen (Mascher *et al.*, 2006). Veränderungen bei PBP2a haben schon für sich genommen Auswirkungen auf das Wachstum von *S. pneumoniae*. Ein Verlust dieses Proteins führt zu einer Erhöhung der Generationszeit. Dieser Effekt zeigt sich unabhängig davon, ob *pbp2a* durch eine Resistenzkassette ersetzt wurde (Paik *et al.*, 1999) oder durch eine Leseraster-Verschiebung die Translation frühzeitig unterbrochen wird, wie in dieser Arbeit gezeigt. In beiden Fällen zeigt sich auch eine vorzeitige Lyse, ohne dass eine stationäre Phase durchlaufen wurde.

Ein niederaffines PBP2a führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Generationszeit, allerdings wird in diesem Fall eine stationäre Phase durchlaufen, welche sogar länger andauert als die des Wildtyps, d.h. die Lyse in der stationären Phase ist deutlich verzögert. Dies könnte darauf hindeuten, dass in den *pbp2a*-Mutanten das CiaRH-System aktiviert sein könnte, ähnlich wie in *pbp2x*- Mutanten, da ein aktiviertes CiaRH-System auch zu einer Reduktion der Lyse führt (Mascher et al., 2006). Daher wurde das CiaRH System in den *pbp2a* Mutanten ausgeschaltet. Inaktivierung des CiaRH-Systems in den *pbp2a* Mutanten führte zu einer verkürzten Generationszeit von 39 min auf 27 min. Das Ausbleiben der stationären Phase und die Lyserate änderten sich jedoch nicht.

In dem Stamm mit dem niederaffinem B6-PBP2a führt die Inaktivierung von CiaRH dagegen zu einer Verkürzung der stationären Phase und einer verfrühten Lyse, ähnlich wie für *pbp2x* Mutanten beschrieben (Mascher et al., 2006; Zerfaß et al., 2009). Ein Einfluß der CiaRH-Inaktivierung auf das Wachstum von R6<sub>*pbp2a*B6</sub> konnte nicht beobachtet werden.

Eine mögliche Klärung der Rolle von CiaRH in PBP2a-Mutanten könnten z.B. Transkriptionsanalysen liefern. Mit Hilfe dieser Experimente könnten Gene und Regulationssysteme detektiert werden, welche Wachstum und Lyse beeinflussen.

## 5.5 Quantifizierung der PBP2x-Moleküle pro Zelle

Bei der Betrachtung von enzymatisch umgesetzten Reaktionen spielt neben der Effektivität der Reaktion auch die Anzahl der katalysierenden Enzyme eine Rolle. PBP2x spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und ist im Septum lokalisiert, während für PBP2a eine Rolle bei der äquatorialen Mureinbiosynthese postuliert wurde (Morlot *et al.*, 2003). Daher ist es von grundsätzlichem Interesse die Anzahl der unterschiedlichen Penicillin-bindenden Proteine zu kennen. Zur Vorbereitung auf die Aufreinigung von und die Experimente mit PBP2a wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl von PBP2x pro Zelle bestimmt. Hierbei wurde auf ein bereits existierendes Konstrukt zur Überexpression eines *S. pneumoniae*-PBP2x-Derivats in *E. coli* zurückgegriffen, welches freundlicherweise von Shwan Rachid zur Verfügung gestellt wurde (Cacciatore *et al.*, 2004). Bei dem PBP2x-Derivat handelt es sich um ein Protein, bei dem die Transmembran-Domäne gentechnisch entfernt wurde, um so die Löslichkeit zu verbessern.

Das bei der Überexpression gewonnene PBP2x wurde zunächst eingesetzt um spezifische Antikörper des PBP2x-Antiserums 1646/13 über PBP2x-Affinitätschromatographie zu reinigen. Die so gewonnene Antikörperfraktion zeigt in Western-Blot-Experimenten eine deutliche Reduktion unspezifische Banden und kann in höheren Verdünnungen eingesetzt werden.

Mit Hilfe des gereinigten Antiserums wurde durch den Vergleich definierter Mengen von *S. pneumoniae* R6-Lysat und gereinigtem PBP2x-Derivat im Western Blot die Menge an PBP2x pro Zelle bestimmt. Die ermittelte Menge von 43475 Molekülen PBP2x pro Zelle, was einem Wert von 18545 Molekülen pro cfu entspricht, unterscheidet sich stark von dem in der Literatur zu findenden Wert von 260 Molekülen PBP2x pro cfu (Noirclerc-Savoie *et al.*, 2005). Allerdings sind die Experimente, die zur Ermittlung dieses Wert führten, nur rudimentär beschrieben, so dass Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Methoden nicht ausgeschlossen werden können. Ergebnisse von ähnlichen Untersuchungen in *E. coli* und *Staphylococcus aureus* sprechen jedoch eher für einen 3-stelligen Wert (Dougherty *et al.*, 1996; Pucci und Dougherty, 2002).

## 5.6 Immunologische Analyse von PBP2a in Labormutanten und klinischen Streptokokken-Isolaten

Die Detektion von PBP mit Bocillin oder radioaktiven  $\beta$ -Lactamen ist abhängig von der Affinität des jeweiligen PBP zum verwendeten Antibiotikum. Außerdem binden diese an mehrere oder sogar alle PBPs. Da Mutationen Einfluss auf die Affinität und das Laufverhalten im Gel haben können ist eine Quantifizierung von PBP in resistenten Stämmen und somit eine Unterscheidung zwischen niedriger Affinität oder geringerer Menge mit dieser Methode nicht möglich.

PBPs können allerdings auch mit Antikörpern markiert werden. Die Darstellung von Antiseren und monoklonalen Antikörpern gegen die PBPs 2x, 2b und 1a und deren Reaktivität gegen PBP in resistenten Stämmen wurde beschrieben (Hakenbeck *et al.*, 1991). Dabei muß allerdings beachtet werden, dass die immunologische Detektion einzelner PBPs, auch solcher deren Affinität gegen beispielsweise Bocillin herabgesetzt ist, nur dann quantitativ ausgewertet werden kann solange die Mutationen niederaffiner Varianten nicht Epitope der Antikörper betreffen.

Zur umfassenderen Analyse der PBP2a-Mutanten stellt ein PBP2a-Antiserum ein wertvolles Werkzeug zur Beantwortung bisher unbeantworteter Fragen dar, zumal es bei den geringen Unterschieden von PBP2a sensitiver und resistenter Stämme unwahrscheinlich ist, dass ein Antiserum hier unterschiedlich reagieren sollte. In dieser Arbeit wurden zwei PBP2a-Derivate dargestellt, gegen die bei der Firma Seqlab (Göttingen) Kaninchen-Antiseren produziert wurden.

Im Gegensatz zum PBP2x-Derivat lagen die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten PBP2a-Derivate PBP2a-TM und PBP2a\_abTM nicht in der löslichen Fraktion des Zellysats vor. Durch die dadurch notwendige Solubilisierung und Umpufferung lag die Ausbeute an Protein bei lediglich 4 mg (PBP2a abTM) bzw. 2,45 mg (PBP2a -TM) pro Liter *E. coli*-Kultur.

Bei Vortests zeigte sich, dass das Anti-PBP2a -TM-Antiserum ( $\alpha$ -PBP2a -TM) keine spezifischen Banden lieferte, wohingegen das Anti-PBP2a abTM-Antiserum ( $\alpha$ -PBP2a abTM) eine deutliche Bande im Bereich von PBP2a lieferte. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den analysierten Seren lediglich um die erste und zweite Blutung des Standard-Immunisierungsschemas handelte. Aus zeitlichen Gründen konnte das spätere Serum nicht mehr getestet werden. Daher wurde auch auf eine Affinitätsreinigung verzichtet und  $\alpha$ -PBP2a abTM für die folgenden Experimente eingesetzt.

Die Translation der PBP2a-Gene von C604, C406 und C403 *in silico* ergibt potentielle Restproteine, die einen N-terminalen Bereich zwischen 42 (C403) und 566 (C604) Aminosäuren umfassen. Im Fall von C604 wäre also sogar die komplette Transglycosylase-Domäne in dem Fragment enthalten.

Anhaltspunkte für solche Restproteine könnten gegebenenfalls durch Western Blot des Zelllysats gefunden werden. Bei keiner der drei C-Mutanten mit PBP2a-Mutationen konnte mit dem Anti-PBP2a-Antiserum eine Bande detektiert werden, die möglicherweise ein PBP2a-Derivat repräsentieren könnte. In der Kontrolle, hier ein Lysat von *S.p.* R6, war eine Bande auf der Höhe von PBP2a deutlich erkennbar (s. Abb. 4.26). Vorausgesetzt, dass Antikörperepitope auch auf den möglichen PBP2a-Derivaten vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass bei allen drei untersuchten C-Mutanten keine verkürzten Restproteine gebildet werden.

Die Untersuchung der PBP2a-Proteine klinischer Streptokokken-Isolate mittels SDS-Page und Bocillin-Markierung ist durch die stark variierende Laufhöhe der PBPs und der dadurch erschwerten Zuordnung limitiert. Der Einsatz eines PBP2a-Antiserums bietet hier eine sinnvolle Ergänzung, zumal sich das Laufverhalten von PBP2a durch einzelne Mutationen deutlich verändert ist. Neben Lysaten von *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* 2349 und *S. mitis* B6 wurden auch ein Lysat von *S. oralis* Uo5 nach SDS-PAGE geblottet und mit  $\alpha$ -PBP2a abTM detektiert.

Wie nach den Experimenten zu den Punktmutationen T<sub>411</sub>>A und Q<sub>431</sub>>L zu erwarten, läuft die PBP2a Bande von *S. mitis* B6 oberhalb der von *S. p.* R6. Bei *S. oralis* Uo5 hingegen ist die Bande des im Vergleich zu *S.p.* R6 deutlich verschiedenen Proteins oberhalb zu finden. Veränderungen in der Laufgeschwindigkeit auf SDS-Gelen sind vor allem bei PBP1a-Varianten beobachtet worden (Hakenbeck et al., 1991) und, bei nahezu identischem Molekulargewicht der verschiedenen Proteine, offenbar auf die unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung zurückzuführen. Die Intensität der PBP2a-spezifischen Bande auf dem Immunoblot ist zwischen *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* 2349 und *S. oralis* Uo5 ähnlich, wohingegen *S. mitis* B6 deutlich schwächer markiert wird. Bemerkenswert hierbei ist, dass *S. oralis* Uo5 sich im Bezug auf die Aminosäure-Sequenz von PBP2a deutlich (8,3% Unterschied) mehr von *S. pneumoniae* R6 unterscheidet als *S. mitis* B6 (3,3%). Somit scheint das Antiserum primär Epitope zu berücksichtigen, die bei *S. mitis* B6 verändert sind, oder PBP2a ist in

*S. mitis* B6 in geringerer Menge vorhanden. Auch hier müssten weitere Experimente mit gereinigten PBP2a Derivaten durchgeführt werden, um die Reaktivität der Antikörper abzuklären.

#### IV. Literaturverzeichnis

Adams, MH, Roe, AS. A Partially Defined Medium for Cultivation of Pneumococcus. J Bacteriol 1945;49(4):401-9

Avery, OT, Macleod, CM, McCarty, M. 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 1944;79(2):137-58

Bergmann C, Chi F, Rachid S, Rachid S, Hakenbeck R () Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins, gene transfer, and cell wall metabolism. In: Tuomanen E, Mitchell TJ, Morrison DA, Spratt BG (ed) The Pneumococcus 2004. ASM press, Washington, D.C., pp 339-34

Bergmann, C. Epidemiologie eines Mosaikgens: pbp2x in  $\beta$ -Lactam-sensitiven und – resistenten oralen Streptokokken aus Spanien. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern; 2003

Bertani, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 1951;62(3):293-300

Birnboim, HC, Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7(6):1513-23

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(0):248-54

Brehm, J, Salmond, G, Minton, N. Sequence of the adenine methylase gene of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. Nucleic Acids Res 1987;15(7):3177

Burnette, WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112(2):195-203

Cacciatore G, Petz M, Rachid S, Hakenbeck R, Bergwerff AA. Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x. *Analytica Chimica Acta* 2004; 520:105-115

Chen, JD, Morrison, DA. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 1988;64(1):155-64

Chesnel, L, Carapito, R, Croizé, J, Dideberg, O, Vernet, T, Zapun, A. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2895-902

Coffey, TJ, Berrón, S, Daniels, M, Garcia-Leoni, ME, Cercenado, E, Bouza, E, Fenoll, A, Spratt, BG. Multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from Spanish hospitals (1988-1994): novel major clones of serotypes 14, 19F and 15F. *Microbiology* 1996;142 ( Pt 10)(0):2747-57

Coffey, TJ, Dowson, CG, Daniels, M, Spratt, BG. Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb Drug Resist* 1995;1(1):29-34

Dagkessamanskaia, A, Moscoso, M, Hénard, V, Guiral, S, Overweg, K, Reuter, M, Martin, B, Wells, J, Claverys, JP. Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol* 2004;51(4):1071-86

Denapaite, D, Brückner, R, Nuhn, M, Reichmann, P, Henrich, B, Maurer, P, Schähle, Y, Selbmann, P, Zimmermann, W, Wambutt, R, Hakenbeck, R. The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? *PLoS One* 2010;5(2)



Di Guilmi, AM, Dessen, A, Dideberg, O, Vernet, T. Bifunctional penicillin-binding proteins: focus on the glycosyltransferase domain and its specific inhibitor moenomycin. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3(2):63-75

Dougherty, TJ, Kennedy, K, Kessler, RE, Pucci, MJ. Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178(21):6110-5

Dowson, CG, Coffey, TJ, Kell, C, Whiley, RA. 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* 1993;9(3):635-43

Dowson, CG, Hutchison, A, Brannigan, JA, George, RC, Hansman, D, Liñares, J, Tomasz, A, Smith, JM, Spratt, BG. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(22):8842-6

Du Plessis, M, Smith, AM, Klugman, KP. Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 2000;6(2):127-31

Figueiredo, AM, Austrian, R, Urbaskova, P, Teixeira, LA, Tomasz, A. Novel penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic and in Slovakia. *Microb Drug Resist* 1995;1(1):71-8

Filipe, SR, Tomasz, A. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(9):4891-6

Ghuysen J M. Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins Annual Review of Microbiology 1991; Vol. 45: 37-67

Gomori, G. *Methods in Enzymology* 1955, vol. 1, p. 138. Ed. by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. New York: Academic Press Inc.

Grebe, T, Hakenbeck, R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(4):829-34

Grebe, T, Paik, J, Hakenbeck, R. A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol* 1997;179(10):3342-9

Griffith F. The significance of pneumococcal types, *J. Hyg.* 1928; 27: 113-159

Guenzi, E, Gasc, AM, Sicard, MA, Hakenbeck, R. A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1994;12(3):505-15

Hakenbeck, R.  $\beta$ -Lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and evolutionary mechanism. *Chemotherapy* 1999; 45:83–94.

Hakenbeck, R, Briese, T, Chalkley, L, Ellerbrok, H, Kalliokoski, R, Latorre, C, Leinonen, M, Martin, C. Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin-resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991;164(2):313-9

Hakenbeck, R., T. Briese, H. Ellerbrok, G. Laible, C. Martin, C. Metelmann, H.-M. Schier and S. Tornette. Targets of  $\beta$ -lactams in *Streptococcus pneumoniae*. In *Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function* 1988; P. Actor, L. Daneo-Moore, M. L. Higgins, M. R. J. Salton, G. D. Shockman, eds., American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 390

Hakenbeck, R., Grebe, T., Zähler, D. & Stock, J. B. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 1999; 33: 673-678.

Hakenbeck, R, Kaminski, K, König, A, van der Linden, M, Paik, J, Reichmann, P, Zähler, D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 1999;5(2):91-9

Hakenbeck, R, König, A, Kern, I, van der Linden, M, Keck, W, Billot-Klein, D, Legrand, R, Schoot, B, Gutmann, L. Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 1998;180(7):1831-40

Hakenbeck, R, Martin, C, Dowson, C, Grebe, T. Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. J Bacteriol 1994;176(17):5574-7

Hakenbeck, R, Tornette, S, Adkinson, NF. Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. J Gen Microbiol 1987;133(3):755-60

Halfmann, A, Kovács, M, Hakenbeck, R, Brückner, R. Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. Mol Microbiol 2007;66(1):110-26

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 1983;166(4):557-80

Heintz, M. Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen; Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern; 2006

Hoskins, J, Matsushima, P, Mullen, DL, Tang, J, Zhao, G, Meier, TI, Nicas, TI, Jaskunas, SR. Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 1999;181(20):6552-5

Izdebski, R, Rutschmann, J, Fiett, J, Sadowy, E, Gniadkowski, M, Hryniewicz, W, Hakenbeck, R. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b, and PBP 1a in isolates of two *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland 23F-16 and Poland 6B-20. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(3):1021-7

Jedrzejas, MJ, Lamani, E, Becker, RS. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. J Biol Chem 2001;276(35):33121-8

Johnsborg, O, Håvarstein, LS. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Rev 2009;33(3):627-42

Klugman, KP, Koornhof, HJ. Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. J Infect Dis 1988;158(5):956-64

König, A, Reinert, RR, Hakenbeck, R. *Streptococcus mitis* with unusually high level resistance to beta-lactam antibiotics. Microb Drug Resist 1998;4(1):45-9

Lacks, S, Hotchkiss, RD. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. Biochim Biophys Acta 1960;39(0):508-18

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680-5

Laible, G, Hakenbeck, R. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1987;1(3):355-63

Laible, G, Spratt, BG, Hakenbeck, R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1991;5(8):1993-2002

Layne, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins, Methods Enzymol 1957: 3: 447-454

Liñares, J, Pallares, R, Alonso, T, Perez, JL, Ayats, J, Gudiol, F, Viladrich, PF, Martin, R. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). Clin Infect Dis 1992;15(1):99-105

Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 1961 3: 208-218.

Marton, A, Gulyas, M, Munoz, R, Tomasz, A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. J Infect Dis 1991;163(3):542-8

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Brock biology of Microorganisms 2000; Prentice -Hall, Inc, New Jersey, USA

Mascher, T, Heintz, M, Zähler, D, Merai, M, Hakenbeck, R. 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 2006;188(5):1959-68

Maurer, P, Koch, B, Zerfass, I, Krauss, J, van der Linden, M, Frère, JM, Contreras-Martel, C, Hakenbeck, R. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: three new mutational pathways for remodelling an essential enzyme into a resistance determinant. J Mol Biol 2008;376(5):1403-16

Morlot, C, Zapun, A, Dideberg, O, Vernet, T. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. Mol Microbiol 2003;50(3):845-55

Mouz, N, Di Guilmi, AM, Gordon, E, Hakenbeck, R, Dideberg, O, Vernet, T. Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. J Biol Chem 1999;274(27):19175-80

Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986;51 Pt 1(0):263-73

Munoz, R, Musser, JM, Crain, M, Briles, DE, Marton, A, Parkinson, AJ, Sorensen, U, Tomasz, A. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus*

*pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. Clin Infect Dis 1992;15(1):112-8

Noirclerc-Savoie, M, Le Gouëllec, A, Morlot, C, Dideberg, O, Vernet, T, Zapun, A. In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 2005;55(2):413-24

Ottolenghi, E, Hotchkiss, RD. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. J Exp Med 1962;116(0):491-519

Paik, J, Kern, I, Lurz, R, Hakenbeck, R. Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. J Bacteriol 1999;181(12):3852-6

Pares, S, Mouz, N, Pétilot, Y, Hakenbeck, R, Dideberg, O. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. Nat Struct Biol 1996;3(3):284-9

Paton, J.C. and J.K. Morona. Pneumococcal Capsular Polysaccharides: Biosynthesis and Regulation. In: Hakenbeck R. M. and S. Chhatwal: Molecular Biology of Streptococci; 2007

Pucci, MJ, Dougherty, TJ. Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2002;184(2):588-91

Reichmann, P, König, A, Liñares, J, Alcaide, F, Tenover, FC, McDougal, L, Swidsinski, S, Hakenbeck, R. A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1997;176(4):1001-12

Reichmann, P, König, A, Marton, A, Hakenbeck, R. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1996;2(2):177-81

Reichmann, P. Epidemiologie und  $\beta$ -Lactamresistenzentwicklung klinischer *Streptococcus pneumoniae*-Isolate. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin; 1996

Renart, J, Reiser, J, Stark, GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76(7):3116-20

Rutschmann, J. *pbp2a* von *Streptococcus pneumoniae* und seine Rolle bei der  $\beta$ -Lactam-Resistenz. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern; 2003

Salles, C, Créancier, L, Claverys, JP, Méjean, V. The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 1992;20(22):6103

Sanbongi, Y, Ida, T, Ishikawa, M, Osaki, Y, Kataoka, H, Suzuki, T, Kondo, K, Ohsawa, F, Yonezawa, M. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(6):2244-50

Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74(12):5463-7

Sibold, C, Henrichsen, J, König, A, Martin, C, Chalkley, L, Hakenbeck, R. Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. Mol Microbiol 1994;12(6):1013-23

Sifaoui, F, Kitzis, MD, Gutmann, L. In vitro selection of one-step mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to different oral beta-lactam antibiotics is associated with alterations of PBP2x. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(1):152-6

Smith, AM, Feldman, C, Massidda, O, McCarthy, K, Ndiweni, D, Klugman, KP. Altered PBP 2A and its role in the development of penicillin, cefotaxime, and ceftriaxone resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(5):2002-7

- Smith, D.B. and Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988; 67: 31-40
- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol.* 1975; 98: 503-517.
- Spratt, BG. Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12,. *Eur J Biochem* 1977;72(2):341-52
- Sung, CK, Li, H, Claverys, JP, Morrison, DA. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(11):5190-6
- Tomasz, A, Hotchkiss, RD. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51(0):480-7
- White B, Robinson ES, Barnes LA. *The biology of pneumococcus* 1979, 2nd ed., Harvard University Press, Cambridge, MA
- Zähner, D, Kaminski, K, van der Linden, M, Mascher, T, Meral, M, Hakenbeck, R. The ciaR/ciaH regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002;4(3):211-6
- Zerfass, I, Hakenbeck, R, Denapaite, D. An important site in PBP2x of penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: mutational analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(3):1107-15
- Zhao, G, Meier, TI, Hoskins, J, Jaskunas, SR. Penicillin-binding protein 2a of *Streptococcus pneumoniae*: expression in *Escherichia coli* and purification and refolding of inclusion bodies into a soluble and enzymatically active enzyme. *Protein Expr Purif* 1999;16(2):331-9



Zhao, G, Meier, TI, Kahl, SD, Gee, KR, Blaszcak, LC. BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1124-8

## **V. Anhang**

Auf den folgenden Seiten ist das in Abb. 4.11 schematisch dargestellte Alignment der *pbp2a<sub>B6</sub>*-Transformanten komplett angegeben. Die Stamm-Bezeichnungen und -Eigenschaften sind der Beschriftung von Abb. 4.11 zu entnehmen.

```

          *          20          *          40
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : -----CGTCATTTGAGGTAGAGAGGC : 21
16-2    : -----TTTACCGTCATTTGAGGTAGAGAGGC : 26
19-2    : TCG-ATCTA-TTGCTTTACCGTCATTTGAGGTAGAGAGGC : 38
19-4    : CCGTACGTAATTGCTTTACCGTCATTTGAGGTAGAGAGGC : 40

```

```

          *          60          *          80
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : GGTTATTGTAATGTGAATTGCATACAGATATTGTAACAA : 61
16-2    : GGGTAATGTAATGTGAATTGCATACAGATATTGTAACAA : 66
19-2    : GGGTAATGTAATGTGAATTGCATACAGATATTGTAACAA : 78
19-4    : GGGTAATGTAATGTGAATTGCATACAGATATTGTAACAA : 80

```

```

          *          100         *          120
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : AAAAAGCCCTATTTGGATAGGAAATAGCTAAATCTTGTC : 101
16-2    : AAAAAGCCCTATTTGGATAGGAAATAGCTAAATCTTGTC : 106
19-2    : AAAAAGCCCTATTTGGATAGGAAATAGCTAAATCTTGTC : 118
19-4    : AAAAAGCCCTATTTGGATAGGAAATAGCTAAATCTTGTC : 120

```

```

          *          140         *          160
SP_R6_S : -----ATGAAATTAG : 10
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : TTCCTATGATGAAGATGATAAAAATAAACGC..... : 141
16-2    : TTCCTATGATGAAGATGATAAAAATAAACGC..... : 146
19-2    : TTCCTATGATGAAGATGATAAAAATAAACGC..... : 158
19-4    : TTCCTATGATGAAGATGATAAAAATAAACGC..... : 160

```

```

          *          180         *          200
SP_R6_S : ATAAATTATTTGAGAAATTTCTTCTCTTTTAAAAAAGA : 50
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 181
16-2    : ..... : 186
19-2    : ..... : 198
19-4    : ..... : 200

```

```

          *          220         *          240
SP_R6_S : AACAAGTGAAGTAGAGGACTCTGATTCTACTATCTTACGT : 90
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 221
16-2    : ..... : 226
19-2    : ..... : 238
19-4    : ..... : 240

```

```

          *          260         *          280
SP_R6_S : CGCTCTCGTAGTGATCGAAAAAATTAGCCCAAGTAGGTC : 130
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 261
16-2    : ..... : 266
19-2    : ..... : 278
19-4    : ..... : 280

```

```

          *          300         *          320
SP_R6_S : CGATTCGAAAATCTGGCGTCGTTATCATCTAACAAAGAT : 170
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 301
16-2    : ..... : 306
19-2    : ..... : 318
19-4    : ..... : 320

```

```

          *           340           *           360
SP_R6_S : TATCCTTATACTAGGTTTGAGTGCAGGCTTGCTAGTTGGA : 210
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 341
16-2    : ..... : 346
19-2    : ..... : 358
19-4    : ..... : 360

```

```

          *           380           *           400
SP_R6_S : ATCTATTTGTTGCTGTAGCCAAGTCGACCAATGTCAATG : 250
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : ..... : 381
16-2    : ..... : 386
19-2    : ..... : 398
19-4    : ..... : 400

```

```

          *           420           *           440
SP_R6_S : ATTTGCAAAATGCCTTGAAAACTCGGACTCTATTTTGA : 290
1-1     : -----C----- : 26
6-4     : ----- : 8
6-5     : -----C----- : 29
16-1    : ..... : 421
16-2    : ..... : 426
19-2    : ..... : 438
19-4    : ..... : 440

```

```

          *           460           *           480
SP_R6_S : CCGTGAAGAAAAAGAGGCTGGTGCCTTGTCTGGTCAAAAG : 330
1-1     : .....A : 66
6-4     : ..... : 48
6-5     : .....A : 69
16-1    : ..... : 461
16-2    : ..... : 466
19-2    : ..... : 478
19-4    : ..... : 480

```

```

          *           500           *           520
SP_R6_S : GGAACCTATGTTGAGCTGACTGACATCAGTAAAAACTTGC : 370
1-1     : .....T.....AT.....T.....T..... : 106
6-4     : ..... : 88
6-5     : .....T.....AT.....T.....T..... : 109
16-1    : .....T.....T..... : 501
16-2    : ..... : 506
19-2    : ..... : 518
19-4    : ..... : 520

```

```

          *           540           *           560
SP_R6_S : AGAATGCTGTTATGCGACAGAAGACCGTTCTTTCTATAA : 410
1-1     : .....G..... : 146
6-4     : .....G..... : 128
6-5     : .....G..... : 149
16-1    : .....G..... : 541
16-2    : ..... : 546
19-2    : ..... : 558
19-4    : ..... : 560

```

```

          *           580           *           600
SP_R6_S : AAATGACGGGATTAACATATGGCCGTTTCTTCTTGCTATT : 450
1-1     : .....T..... : 186
6-4     : .....T..... : 168
6-5     : .....T..... : 189
16-1    : .....T..... : 581
16-2    : ..... : 586
19-2    : ..... : 598
19-4    : ..... : 600

```

```

          *           620           *           640
SP_R6_S : GTCAGTCTGGACGTTTCAGGTGGTGGCTCTACCATTACCC : 490
1-1     : .....T.....A..T.....T..... : 226
6-4     : .....T.....A..T.....T..... : 208
6-5     : .....T.....A..T.....T..... : 229
16-1    : .....T.....A..T.....T..... : 621
16-2    : ..... : 626
19-2    : ..... : 638
19-4    : ..... : 640

```

```

          *           660           *           680
SP_R6_S : AACAGCTGGCTAAAAACGCCTATTTATCGCAGGATCAAAC : 530
1-1     : .....G..... : 266
6-4     : .....G..... : 248
6-5     : .....G..... : 269
16-1    : .....G..... : 661
16-2    : ..... : 666
19-2    : ..... : 678
19-4    : ..... : 680

```

```

          *           820           *           840
SP_R6_S : AGAAGATGCGAGTAAGAAATACTTGGAGTTTCATCA : 690
1-1     : ..... : 426
6-4     : ..... : 408
6-5     : ..... : 429
16-1    : ..... : 821
16-2    : ..... : 826
19-2    : ..... : 838
19-4    : ..... : 840

```

```

          *           700           *           720
SP_R6_S : TGTGAGAGAAAAGCGAAAGAAATTTTCCTTGCCTTAGAA : 570
1-1     : ..... : 306
6-4     : ..... : 288
6-5     : ..... : 309
16-1    : ..... : 701
16-2    : ..... : 706
19-2    : ..... : 718
19-4    : ..... : 720

```

```

          *           860           *           880
SP_R6_S : GAAGTGAGTCTGGATCAAGCTGCGACTCTGGCAGGGATGC : 730
1-1     : .C.....T.....A..... : 466
6-4     : .C.....T.....A..... : 448
6-5     : .C.....T.....A..... : 469
16-1    : .C.....T.....A..... : 861
16-2    : ..... : 866
19-2    : ..... : 878
19-4    : .C.....T.....A..... : 880

```

```

          *           740           *           760
SP_R6_S : TTAAGCAAAAAATATAGTAAGGAGCAAATCTAACCATGT : 610
1-1     : ...CA.....T.....T..... : 346
6-4     : ...CA.....T.....T..... : 328
6-5     : ...CA.....T.....T..... : 349
16-1    : ...CA.....T.....T..... : 741
16-2    : ..... : 746
19-2    : ..... : 758
19-4    : ...CA.....T.....T..... : 760

```

```

          *           900           *           920
SP_R6_S : TCAAGGGCCCGAACTGTATAATCCCTTGAAATCCGTAGA : 770
1-1     : ...A.....T.....C..... : 506
6-4     : ...A.....T.....C..... : 488
6-5     : ...A.....T.....C..... : 509
16-1    : ...A.....T.....C..... : 901
16-2    : ..... : 906
19-2    : ..... : 918
19-4    : ...A.....T.....C..... : 920

```

```

          *           780           *           800
SP_R6_S : ACCTTAACAACGCTTATTTGGAAATGGTGTGTGGGGTGT : 650
1-1     : ..... : 386
6-4     : ..... : 368
6-5     : ..... : 389
16-1    : ..... : 781
16-2    : ..... : 786
19-2    : ..... : 798
19-4    : ..... : 800

```

```

          *           940           *           960
SP_R6_S : AGATTCTACTAATCGGCGGATACTGTCTTGCAGAATATG : 810
1-1     : .....G.....T.....A..... : 546
6-4     : .....G.....T.....A..... : 528
6-5     : .....G.....T.....A..... : 549
16-1    : .....G.....T.....A..... : 941
16-2    : .....G.....T.....A..... : 946
19-2    : ..... : 958
19-4    : .....G.....T.....A..... : 960

```

```

          *           980           *           1000
SP_R6_S : GTTGCAGCAGGATATATTGATAAAAAACCAAGAAACCGAAG : 850
1-1     : .....A..... : 586
6-4     : .....A..... : 568
6-5     : .....A..... : 589
16-1    : .....A..... : 981
16-2    : .....A..... : 986
19-2    : .....A..... : 998
19-4    : .....A..... : 1000

```

```

          *           1020           *           1040
SP_R6_S : CTGCTGAAGTTGATATGACTTCGCAATTGCACGATAAGTA : 890
1-1     : .....A..... : 626
6-4     : .....A..... : 608
6-5     : .....A..... : 629
16-1    : .....A..... : 1021
16-2    : .....A..... : 1026
19-2    : .....A..... : 1038
19-4    : .....A..... : 1040

```

```

          *           1060           *           1080
SP_R6_S : TGAAGGAAAAATCTCAGATTACCGTTACCCCTCTATTTT : 930
1-1     : .....T..C..T..T....C... : 666
6-4     : .....T..C..T..T....C... : 648
6-5     : .....T..C..T..T....C... : 669
16-1    : .....T..C..T..T....C... : 1061
16-2    : .....T..C..T..T....C... : 1066
19-2    : .....T..C..T..T....C... : 1078
19-4    : .....T..C..T..T....C... : 1080

```

```

          *           1100           *           1120
SP_R6_S : GATGCGGTGGTTAATGAAGCTGTTTCCAAGTATAATCTAA : 970
1-1     : .....T..... : 706
6-4     : .....T..... : 688
6-5     : .....T..... : 709
16-1    : .....T..... : 1101
16-2    : .....T..... : 1106
19-2    : .....T..... : 1118
19-4    : .....T..... : 1120

```

```

          *           1140           *           1160
SP_R6_S : CAGAGGAAGAGATTGTCAATAATGGCTACCGCATTACAC : 1010
1-1     : .....A..... : 746
6-4     : .....A..... : 728
6-5     : .....A..... : 749
16-1    : .....A..... : 1141
16-2    : .....A..... : 1146
19-2    : .....A..... : 1158
19-4    : .....A..... : 1160

```

```

          *           1180           *           1200
SP_R6_S : AGAGCTGGACCAAACTACCAAGCAAATATGCAGATTGTT : 1050
1-1     : ...A.....G...C : 786
6-4     : ...A.....G...C : 768
6-5     : ...A.....G...C : 789
16-1    : ...A.....G...C : 1181
16-2    : ...A.....G...C : 1186
19-2    : ...A.....G...C : 1198
19-4    : ...A.....G...C : 1200

```

```

          *           1220           *           1240
SP_R6_S : TATGAAAACACATCGCTATTTCCGAGGGCAGAGGATGGAA : 1090
1-1     : .....T...G..... : 826
6-4     : .....T...G..... : 808
6-5     : .....T...G..... : 829
16-1    : .....T...G..... : 1221
16-2    : .....T...G..... : 1226
19-2    : .....T...G..... : 1238
19-4    : .....T...G..... : 1240

```

```

          *           1260           *           1280
SP_R6_S : CGTTTGCTCAATCAGGAAGTGTAGCTCTCGAACCGAAAAC : 1130
1-1     : .A.....C..... : 866
6-4     : .A.....C..... : 848
6-5     : .A.....C..... : 869
16-1    : .A.....C..... : 1261
16-2    : .A.....C..... : 1266
19-2    : .A.....C..... : 1278
19-4    : .A.....C..... : 1280

```

```

          *      1300      *      1320
SP_R6_S : AGGGGGAGTTCGTGGAGTTGTCGGTCAAGTTGCTGACAAT : 1170
1-1      : .....T... : 906
6-4      : .....T... : 888
6-5      : .....T... : 909
16-1     : .....T... : 1301
16-2     : .....T... : 1306
19-2     : .....T... : 1318
19-4     : .....T... : 1320

```

```

          *      1460      *      1480
SP_R6_S : CAGTTGGATAACCATACCATGCAGTATGATAGCTATAAGG : 1330
1-1      : .TC.....C..C.....C : 1066
6-4      : .TC.....C..C.....C : 1048
6-5      : ..... : 1069
16-1     : .TC.....C..C.....C : 1461
16-2     : .TC.....C..C.....C : 1466
19-2     : .TC.....C..C.....C : 1478
19-4     : .TC.....C..C.....C : 1480

```

```

          *      1340      *      1360
SP_R6_S : GATAAACTGGATTCCGGAATTTCAACTATGCAACCCAAT : 1210
1-1      : ..... : 946
6-4      : .....T... : 928
6-5      : .....T... : 949
16-1     : .....T... : 1341
16-2     : .....T... : 1346
19-2     : .....T... : 1358
19-4     : .....T... : 1360

```

```

          *      1500      *      1520
SP_R6_S : TTGATAACTATGCAGGGATCAAAACAAGTCGAGAAGTTCC : 1370
1-1      : .....A.....G..... : 1106
6-4      : .....A.....G..... : 1088
6-5      : ..... : 1109
16-1     : .....A.....G..... : 1501
16-2     : .....A.....G..... : 1506
19-2     : .....A.....G..... : 1518
19-4     : .....A.....G..... : 1520

```

```

          *      1380      *      1400
SP_R6_S : CAAAGCGTAGTCCTGGTTCTACAATTAAGCCTTTAGTTGT : 1250
1-1      : ...A.....G..... : 986
6-4      : ...A.....G..... : 968
6-5      : ...A.....G..... : 989
16-1     : ...A.....G..... : 1381
16-2     : ...A.....G..... : 1386
19-2     : ...A.....G..... : 1398
19-4     : ...A.....G..... : 1400

```

```

          *      1540      *      1560
SP_R6_S : TATGTATCAATCCTTGGCAGAAATCGCTTAATCTACCTGCT : 1410
1-1      : .....G.....G.....G..... : 1146
6-4      : .....G.....G.....G..... : 1128
6-5      : ..... : 1149
16-1     : .....G.....G.....G..... : 1541
16-2     : .....G.....G.....G..... : 1546
19-2     : .....G.....G.....G..... : 1558
19-4     : .....G.....G.....G..... : 1560

```

```

          *      1420      *      1440
SP_R6_S : TTATACACCAGCAGTTGAAGCAGGCTGGGCTTTGAATAAG : 1290
1-1      : .....G..... : 1026
6-4      : .....G..... : 1008
6-5      : .....G..... : 1029
16-1     : .....G..... : 1421
16-2     : .....G..... : 1426
19-2     : .....G..... : 1438
19-4     : .....G..... : 1440

```

```

          *      1580      *      1600
SP_R6_S : GTTGCCACTGTTAATGATTTGGGTGTTGACAAGGCTTTTG : 1450
1-1      : .....C....T..... : 1186
6-4      : .....C....T..... : 1168
6-5      : ..... : 1189
16-1     : .....C....T..... : 1581
16-2     : .....C....T..... : 1586
19-2     : .....C....T..... : 1598
19-4     : .....C....T..... : 1600

```

```

          *           1620           *           1640
SP_R6_S : AGGCAGGCGAAAAATTCGGACTCAACATGGAAAAGGTCGA : 1490
1-1      : ...G.....A..T.. : 1226
6-4      : ...G.....A..T.. : 1208
6-5      : ..... : 1229
16-1     : ...G.....A..T.. : 1621
16-2     : ...G.....A..T.. : 1626
19-2     : ...G.....A..T.. : 1638
19-4     : ...G.....A..T.. : 1640

```

```

          *           1660           *           1680
SP_R6_S : CCGTGTTCCTGGTGTTCGCCTGGGAAGCGGTGTTGAAACC : 1530
1-1      : T.....A..... : 1266
6-4      : T.....A..... : 1248
6-5      : ..... : 1269
16-1     : T.....A..... : 1661
16-2     : T.....A..... : 1666
19-2     : T.....A..... : 1678
19-4     : T.....A..... : 1680

```

```

          *           1700           *           1720
SP_R6_S : AACCTCTTCAAATGGCTCAAGCATACGCTGCCTTTGCAA : 1570
1-1      : ..T....G.....T..... : 1306
6-4      : ..T....G.....T..... : 1288
6-5      : ..... : 1309
16-1     : ..T....G.....T..... : 1701
16-2     : ..T....G.....T..... : 1706
19-2     : ..T....G.....T..... : 1718
19-4     : ..T....G.....T..... : 1720

```

```

          *           1740           *           1760
SP_R6_S : ATGAAGGTTAATGCCTGAAGCTCATTTTATTAGTAGAAT : 1610
1-1      : .....G..... : 1346
6-4      : .....G..... : 1328
6-5      : ..... : 1349
16-1     : ..... : 1741
16-2     : .....G..... : 1746
19-2     : .....G..... : 1758
19-4     : .....G..... : 1760

```

```

          *           1780           *           1800
SP_R6_S : TGAAAATGCTAGTGGACAAGTTATTGCGAGTCATAAAAAAT : 1650
1-1      : .....T..G..C.....C..... : 1386
6-4      : .....T..G..C.....C..... : 1368
6-5      : ..... : 1389
16-1     : ..... : 1781
16-2     : .....T..G..C.....C..... : 1786
19-2     : .....T..G..C.....C..... : 1798
19-4     : .....T..G..C.....C..... : 1800

```

```

          *           1820           *           1840
SP_R6_S : TCACAAAACGGGTGATTGATAAGTCTGTAGCTGACAAGA : 1690
1-1      : ..... : 1426
6-4      : ..... : 1408
6-5      : ..... : 1429
16-1     : ..... : 1821
16-2     : ..... : 1826
19-2     : ..... : 1838
19-4     : ..... : 1840

```

```

          *           1860           *           1880
SP_R6_S : TGACCAGTATGATGTTGGGGACTTTCACCAACGGTACCGG : 1730
1-1      : .....A..A..T..A.....A.AA.. : 1466
6-4      : .....A..A..T..A.....A.AA.. : 1448
6-5      : ..... : 1469
16-1     : ..... : 1861
16-2     : .....A..A..T..A.....A.AA.. : 1866
19-2     : .....A..A..T..A.....A.AA.. : 1878
19-4     : .....A..A..T..A.....A.AA.. : 1880

```

```

          *           1900           *           1920
SP_R6_S : TATTAGTTCATCGCCTGCAGACTATGTCATGGCAGGGAAA : 1770
1-1      : .....A... : 1506
6-4      : .....A... : 1488
6-5      : ..... : 1509
16-1     : ..... : 1901
16-2     : .....A... : 1906
19-2     : .....A... : 1918
19-4     : .....A... : 1920

```



```

          *      1940      *      1960
SP_R6_S : ACTGGAACAACCTGAAGCAGTTTCAATCCGGAGTACACAA : 1810
1-1      : .....A..T..T.... : 1546
6-4      : ..... : 1528
6-5      : ..... : 1549
16-1     : ..... : 1941
16-2     : .....A..T..T.... : 1946
19-2     : .....A..T..T.... : 1958
19-4     : .....A..T..T.... : 1960

```

```

          *      1980      *      2000
SP_R6_S : GTGACCAGTGGGTAATTGGTTATACTCCGGATGTAGTGAT : 1850
1-1      : .....A..... : 1586
6-4      : ..... : 1568
6-5      : ..... : 1589
16-1     : ..... : 1981
16-2     : .....A..... : 1986
19-2     : .....A..... : 1998
19-4     : .....A..... : 2000

```

```

          *      2020      *      2040
SP_R6_S : TAGCCACTGGCTGGCTTTCCGACCACTGATGAAAATCAC : 1890
1-1      : ...T.....T..C....G.....T : 1626
6-4      : ..... : 1608
6-5      : ..... : 1629
16-1     : ..... : 2021
16-2     : ...T.....T..C....G.....T : 2026
19-2     : ...T.....T..C....G.....T : 2038
19-4     : ...T.....T..C....G.....T : 2040

```

```

          *      2060      *      2080
SP_R6_S : TATCTAGCTGGCTCTACTTCAAACGGTGCAGCTCATGTCT : 1930
1-1      : .....A.....T..... : 1666
6-4      : ..... : 1648
6-5      : ..... : 1669
16-1     : ..... : 2061
16-2     : .....A.....T..... : 2066
19-2     : .....A.....T..... : 2078
19-4     : .....A.....T..... : 2080

```

```

          *      2100      *      2120
SP_R6_S : TTAGAAACATTGCCAATACTATTTTACCTTATACGCCAGG : 1970
1-1      : .....C..... : 1706
6-4      : ..... : 1688
6-5      : ..... : 1709
16-1     : ..... : 2101
16-2     : .....C..... : 2106
19-2     : .....C..... : 2118
19-4     : .....C..... : 2120

```

```

          *      2140      *      2160
SP_R6_S : AAGTACCTTTACGGTTGAAAATGCTTATAAGCAAAATGGA : 2010
1-1      : .....A..... : 1746
6-4      : ..... : 1728
6-5      : ..... : 1749
16-1     : ..... : 2141
16-2     : ..... : 2146
19-2     : .....A..... : 2158
19-4     : .....A..... : 2160

```

```

          *      2180      *      2200
SP_R6_S : ATTGCACCAGCCAATACAAAAGACAAGTACAAACCAATG : 2050
1-1      : .....T..C..... : 1786
6-4      : ..... : 1768
6-5      : ..... : 1789
16-1     : ..... : 2181
16-2     : ..... : 2186
19-2     : .....T..C..... : 2198
19-4     : .....T..C..... : 2200

```

```

          *      2220      *      2240
SP_R6_S : ATAATAGCCAGACAGATGATAATTTGTCTGATATTCGAGG : 2090
1-1      : ..... : 1826
6-4      : ..... : 1777
6-5      : ..... : 1829
16-1     : ..... : 2221
16-2     : ..... : 2226
19-2     : ..... : 2238
19-4     : ..... : 2240

```

```

          *      2260      *      2280
SP_R6_S : GCGTGCACAAAGCTTAGTAGATGAGGCTAGCCGGCTATC : 2130
1-1     : A..... : 1832
6-4     : ----- : -
6-5     : ..... : 1869
16-1    : ..... : 2261
16-2    : ..... : 2266
19-2    : ..... : 2278
19-4    : ..... : 2280

```

```

          *      2300      *      2320
SP_R6_S : TCAGATGCGAAGATTAAGGAAAAGGCTCAAACAATATGGG : 2170
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ..... : 1878
16-1    : ..... : 2301
16-2    : ..... : 2306
19-2    : ..... : 2318
19-4    : ..... : 2320

```

```

          *      2340      *      2360
SP_R6_S : ATTCGATAGTCAATCTATTTTCGCTAA----- : 2196
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : .....GATGCTTGTCAAAG : 2341
16-2    : .....GATGCTTGTCAAAG : 2346
19-2    : .....GATGCTTGTCAAAG : 2358
19-4    : .....GATGCTTGTCAAAG : 2360

```

```

          *      2380      *      2400
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : CCTAGCTTCTTGTTATAATGGATAAGATGGAGGCGTTAT : 2381
16-2    : CCTAGCTTCTTGTTATAATGGATAAGATGGAGGCGTTAT : 2386
19-2    : CCTAGCTTCTTGTTATAATGGATAAGATGGAGGCGTTAT : 2398
19-4    : CCTAGCTTCTTGTTATAATGGATAAGATGGAGGCGTTAT : 2400

```

```

          *      2420      *      2440
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : GGCATAAAAAAGCAAGCCTAGCTTGTGCGGTTTGTGGT : 2421
16-2    : GGCATAAAAAACACG----- : 2402
19-2    : GGCATAAAAAAGCAAGCCTAGCTTGTGCGGTTTGTGGT : 2438
19-4    : GGCATAAAAAACAGA----- : 2416

```

```

          *
SP_R6_S : ----- : -
1-1     : ----- : -
6-4     : ----- : -
6-5     : ----- : -
16-1    : TCGAGAACTA : 2432
16-2    : -CGAAAACC-- : 2410
19-2    : TCGAGAACTA : 2449
19-4    : --GGCAAA--- : 2422

```



## Lebenslauf

- seit 2009 Fachreferent für Impfstoffe, medicatis GmbH, Ibbenbüren
- 2007 - 2009 Pharmaberater/Fachreferent für Impfstoffe, Innovex GmbH, Mannheim
- 2003 - 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Hakenbeck
- 2002 - 2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Hakenbeck
- Titel der Diplomarbeit: „*pbp2a* von *Streptococcus pneumoniae* und seine Rolle bei der  $\beta$ -Lactam-Resistenz“
- 1998 - 2003 Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern
- 1997 - 1998 Grundwehrdienst
- 1988 - 1997 Otfried von Weißenburg-Gymnasium, Dahn  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1984 - 1988 Grundschule Dahn
- 21.05.1978 geboren in Annweiler am Trifels



## Meinen herzlichen Dank an ...

- ..... Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die anregenden Diskussionen und die Geduld.
- ..... Herrn Prof. Dr. John A. Cullum für die Zweitkorrektur dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Burkhard Büdel für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.
- ..... Reinhold, Peter, Bernhard, Patrick und Dalia für die vielen Gespräche über Pneumokokken, Fußball, Proteine, Politik, Gott und die Welt.
- ..... Thomas, Manuel, Alexander und alle anderen Laborkollegen und Mitstreiter für die tolle Atmosphäre und die schöne Zeit.
- ..... unsere TAs, die an dieser Stelle häufig vergessen werden.
- ..... meine Eltern für die Möglichkeit, da zu sein wo ich war, bin und sein werde.
- ..... meine Frau Susanne für die Geduld, den Ansporn und die Liebe.

