

Horizontaler Gentransfer zwischen  
*Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* –  
Analyse der Resistenzentwicklung

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

von

**Dipl.-Biol. Julia Sauerbier**

Datum der wissenschaftlichen Aussprache  
29.03.2012

Vorsitzender der Prüfungskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn  
1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck  
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2012

D386

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

Hiermit erkläre ich, Julia Sauerbier, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, Januar 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Die Gattung <i>Streptococcus</i> .....	4
2.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
2.1.2 <i>Streptococcus mitis</i> .....	5
2.2 Peptidoglykanbiosynthese – MurM und Penicillin-bindende Proteine (PBP).....	6
2.3 $\beta$ -Lactamresistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	12
2.3.1 $\beta$ -Lactamantibiotika.....	12
2.3.2 PBP-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz in <i>S. pneumoniae</i> .....	13
2.3.3 Nicht-PBP-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz in <i>S. pneumoniae</i> .....	14
2.4 Entwicklung und Ausbreitung der $\beta$ -Lactamresistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
2.4.1 Natürliche Kompetenz in <i>S. pneumoniae</i> .....	16
2.4.2 Ausbreitung der $\beta$ -Lactamresistenz durch horizontalen Gentransfer .....	16
2.4.3 Die CCCB-Transformantenfamilie .....	17
2.5 Zielsetzung.....	19
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Bakterienstämme .....	20
3.2 Plasmide .....	22
3.3 Oligonukleotide .....	23
3.4 Nährmedien.....	27
3.4.1 C-Medium (CpH8).....	27
3.4.2 D-Blutagar .....	29
3.4.3 LB-Medium und -Agar .....	30
3.5 Antibiotika.....	30
3.6 Anzucht und Wachstum.....	30
3.7 Stammkonservierung .....	31
3.8 Mikroskopie .....	31
3.9 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	32
3.9.1 Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> .....	32
3.9.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	33
3.10 Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	33

---

3.10.1	Herstellung kompetenter Zellen von <i>S. pneumoniae</i> .....	33
3.10.2	Transformation und Bestimmung der Transformationseffizienz von <i>S. pneumoniae</i> .....	33
3.11	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	34
3.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.13	Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptokokken .....	35
3.14	Isolierung von RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	37
3.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	38
3.15.1	Überlappende PCR.....	41
3.16	Agarose-Gelelektrophorese.....	42
3.16.1	DNA-Elution aus Agarosegelen.....	44
3.17	Restriktion von DNA.....	44
3.18	Ligation von DNA-Fragmenten .....	44
3.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.20	Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Gelelektrophorese .....	47
3.21	Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen mit Bocillin .....	48
3.22	Immunodetektion von Proteinen - Western Blot.....	48
3.23	Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	50
3.24	Bandshift Assay.....	52
3.25	Microarray-Analyse .....	54
3.25.1	Verwendete Oligonukleotid-Sets.....	55
3.25.1.1	Das <i>S. pneumoniae</i> R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set .....	55
3.25.1.2	Das <i>S. mitis</i> B6-Oligonukleotid-Set.....	56
3.25.2	Herstellung der Microarray-Slides .....	56
3.25.3	Markierung der Nukleinsäure mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	58
3.25.3.1	Fluoreszenzmarkierung von chromosomaler DNA.....	58
3.25.3.2	Fluoreszenzmarkierung von Gesamt-RNA .....	59
3.25.4	Hybridisierung.....	60
3.25.5	Datenerfassung der Microarrays.....	61
3.25.5.1	Scannen der hybridisierten Microarray-Slides .....	61
3.25.5.2	Bioinformatische Datenanalyse .....	62
3.26	Konstruktion von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Derivaten.....	63
3.26.1	Konstruktion der CCCO Stämme mit verschiedenen <i>murM</i> Allelen .....	63
3.26.2	Konstruktion der Deletionsderivate CCCO $\Delta murM$ und CCCO <i>murMN::janus</i> .....	64
3.26.3	Konstruktion der Deletionsderivate R6 $\Delta spr0683$ und CCCB $\Delta spr0683$ .....	66
3.26.4	Konstruktion verschiedener Deletionen von <i>spr1851</i> in R6 und CCCB .....	66
3.26.5	Konstruktion der Transformante CCCB <i>smi0217</i> .....	67
3.26.6	Konstruktion der <i>clpL</i> Deletion in R6 und CCCB .....	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
4.1	Der Einfluss von PBP2a aus <i>Streptococcus mitis</i> B6 auf die $\beta$ -Lactamresistenz .....	70
4.2	Charakterisierung des Resistenzunterschieds zwischen CCCO und CCCB .....	71

---

4.2.1	Phänotypische Auswirkungen verschiedener MurM Allele .....	73
4.2.1.1	Die MurM-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz .....	75
4.2.1.2	Der Einfluss von MurM auf das Wachstumsverhalten.....	78
4.2.2	Der Beitrag von PBP2b zur Penicillinresistenz von CCCB .....	80
4.3	Identifizierung weiterer Resistenzdeterminanten .....	82
4.3.1	Isolierung von CCCB-Derivaten mit erhöhter Resistenz.....	83
4.3.1.1	Genomische Veränderungen von CCCB B2.....	84
4.3.1.2	Genomische Veränderungen von CCCB O6 .....	86
4.3.2	Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 – phänotypische Auswirkungen .....	90
4.3.2.1	Deletionen von spr0683 und spr1851 – Auswirkungen auf die $\beta$ - Lactamresistenz .....	91
4.3.2.2	Deletionen von spr0683 und spr1851 – Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten .....	94
4.3.2.3	Transkriptionsprofile von R6 $\Delta$ spr0683 und R6 spr1851:: <i>janus</i> .....	97
4.3.3	Der Einfluss von ClpL auf die Phänotypen der Deletionsderivate.....	102
4.3.3.1	Die ClpL-Menge in den Deletionsderivaten von spr0683 und spr1851.....	103
4.3.3.2	Der Einfluss einer <i>clpL</i> -Deletion auf die $\beta$ -Lactamresistenz und das Wachstum der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 .....	104
4.3.3.3	Der Einfluss der ClpL-Menge auf die PBP2x-Menge .....	106
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>108</b>
5.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 PBP2a und die $\beta$ -Lactamresistenz.....	108
5.2	Genomischer Unterschied zwischen CCCO und CCCB – die MurM- und PBP2b- vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz.....	110
5.2.1	Die MurM-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz.....	111
5.2.2	Die PBP2b-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz.....	116
5.3	Identifizierung neuer Resistenzdeterminanten – Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 .....	117
5.3.1	Verbreitung der KH- und R3H-Domäne.....	119
5.3.2	Die phänotypischen Auswirkungen der Deletionen von spr0683 und spr1851 ..	121
5.3.3	Die Phänotypen der Deletionsderivate – welche Rolle spielt ClpL?.....	125
5.4	Ausblick.....	126
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>143</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>145</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>146</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>147</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung später Schritte der Peptidoglykanbiosynthese in <i>S. pneumoniae</i> .....	8
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung der PBP aus <i>S. pneumoniae</i> .....	10
Abbildung 2.3:	Grundstruktur der Penicilline und Cephalosporine .....	13
Abbildung 2.4:	Die CCCB-Transformantenfamilie und deren PBP-Profile .....	18
Abbildung 3.1:	Konstruktion des <i>murM</i> -Minigens in CCCO mithilfe der Janus-Kassette ...	65
Abbildung 3.2:	Deletion von <i>clpL</i> in <i>S. pneumoniae</i> R6.....	68
Abbildung 4.1:	Cefotaxim- und Penicillinresistenz von CCCO und CCCB.....	72
Abbildung 4.2:	Vergleich von MurM aus <i>S. pneumoniae</i> R6, Hu17, CCCB und <i>S. mitis</i> B6.....	74
Abbildung 4.3:	Cefotaximresistenz in Abhängigkeit verschiedener <i>murM</i> Allele.....	76
Abbildung 4.4:	Penicillinresistenz in Abhängigkeit verschiedener <i>murM</i> Allele.....	77
Abbildung 4.5:	Wachstumsverhalten von CCCO mit <i>murM</i> <sub>CCCB</sub> sowie den <i>murMN</i> Deletionsderivaten .....	79
Abbildung 4.6:	Schematische Darstellung von PBP2b aus CCCO und CCCB .....	81
Abbildung 4.7:	Penicillinresistenz in Abhängigkeit von <i>murM</i> und <i>pbp2b</i> .....	82
Abbildung 4.8:	Rekombinationsereignisse in spr1851.....	88
Abbildung 4.9:	Resistenzprofile der CCCB-Derivate mit smi0217 und diversen spr1851-Deletionen.....	89
Abbildung 4.10:	β-Lactamresistenz der Deletionsderivate von spr0683 und spr1815 in CCCB.....	92
Abbildung 4.11:	β-Lactamresistenz der Deletionsderivate von spr0683 und spr1815 in R6 .....	93
Abbildung 4.12:	Das Wachstum der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 .....	96
Abbildung 4.13:	Transkriptionsprofil von R6 Δspr0683.....	99
Abbildung 4.14:	Transkriptionsprofil von R6 spr1851:: <i>janus</i> .....	101
Abbildung 4.15:	Western Blot zur Detektion der ClpL-Menge in den R6- und CCCB-Derivaten .....	104
Abbildung 4.16:	Piperacillinresistenz der <i>clpL</i> -Deletionsderivate .....	105
Abbildung 4.17:	Western Blot zur Detektion der PBP2x-Menge in den R6- und CCCB-Derivaten .....	107
Abbildung 5.1:	Genomischer Unterschied zwischen CCCO und CCCB .....	111
Abbildung 5.2:	Schematische Darstellung von Spr0683 und Spr1851 .....	119

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Verwendete Stämme und Ausgangsstämme der Gattung <i>Streptococcus</i> .....	20
Tabelle 3.2:	Für diese Arbeit hergestellte Derivate von <i>S. pneumoniae</i> .....	21
Tabelle 3.3:	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme .....	22
Tabelle 3.4:	Verwendete Plasmide .....	22
Tabelle 3.5:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung verschiedener <i>murM</i> Allele .....	23
Tabelle 3.6:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp1a</i> , <i>pbp2a</i> und <i>pbp2x</i> .....	23
Tabelle 3.7:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp2b</i> .....	24
Tabelle 3.8:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>ciaH</i> .....	24
Tabelle 3.9:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von spr0683 .....	24
Tabelle 3.10:	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von spr1850, spr1851 .....	25
Tabelle 3.11:	Oligonukleotide zur Klonierung verschiedener <i>murM</i> Allele sowie zur Inaktivierung von <i>murM</i> und <i>murN</i> .....	25
Tabelle 3.12:	Oligonukleotide zur Inaktivierung von spr0683 .....	25
Tabelle 3.13:	Oligonukleotide zum Austausch von spr1851 gegen smi_0217 .....	26
Tabelle 3.14:	Oligonukleotide zur Inaktivierung von spr1851 .....	26
Tabelle 3.15:	Oligonukleotide zur Sequenzierung und Inaktivierung von <i>cplL</i> .....	26
Tabelle 3.16:	Oligonukleotide zur Klonierung von spr0683 und spr1851 für die Proteinüberexpression .....	27
Tabelle 3.17:	Zusammensetzung des C-Mediums .....	27
Tabelle 3.18:	Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums .....	28
Tabelle 3.19:	Zusammensetzung des D-Agars .....	29
Tabelle 3.20:	Verwendete Antibiotika .....	30
Tabelle 3.21:	Lösungen zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	32
Tabelle 3.22:	D-Blutagarplatten für die MHK-Bestimmung .....	35
Tabelle 3.23:	Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken .....	36
Tabelle 3.24:	Lösungen zur Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. pneumoniae</i> .....	38
Tabelle 3.25:	Reaktionsansatz der GoldStar® DNA-Polymerase .....	39
Tabelle 3.26:	Reaktionsansatz der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase .....	40
Tabelle 3.27:	PCR-Programm der GoldStar® DNA-Polymerase .....	40
Tabelle 3.28:	PCR-Programm der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase .....	40
Tabelle 3.29:	Reaktionsansatz einer überlappenden PCR mit der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase .....	42
Tabelle 3.30:	PCR-Programm einer überlappenden PCR mit der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase .....	42
Tabelle 3.31:	Verwendete Puffer zur Herstellung .....	43
Tabelle 3.32:	Zusammensetzung eines 5 %-igen Sammelgels .....	46
Tabelle 3.33:	Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE .....	46
Tabelle 3.34:	Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....	46
Tabelle 3.35:	Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot .....	49



---

Tabelle 3.36:	Verwendete Puffer und Lösungen für die Überexpression von GST-Fusionsproteinen .....	52
Tabelle 3.37:	Verwendete Puffer und Lösungen für Bandshift Assays .....	53
Tabelle 3.38:	Zusammensetzung eines TGE-Polyacrylamidgels (8 %) .....	54
Tabelle 3.39:	Zusammensetzung des Spotting-Puffers.....	55
Tabelle 3.40:	Spotting Protokoll der Spot-Array™ Software.....	57
Tabelle 3.41:	Reaktionsansatz zur Fluoreszenzmarkierung von chromosomaler DNA ...	59
Tabelle 3.42:	Verwendete Puffer für die Hybridisierung .....	60
Tabelle 3.43:	Hybridisierungsprotokoll.....	61
Tabelle 4.1:	Cefotaxim-MHK der R6 Derivate mit PBP2x und PBP2a aus <i>S. mitis</i> B6 ..	71
Tabelle 4.2:	Generationszeiten von CCCO mit <i>murM</i> <sub>CCCB</sub> .....	80
Tabelle 4.3:	Selektion und Transformationseffizienz der CCCB-Transformanten.....	83
Tabelle 4.4:	Vergleich der Resistenzprofile von CCCB und <i>S. mitis</i> B6 .....	83
Tabelle 4.5:	Resistenzprofile der CCCB-Derivate B2 und O6 .....	84
Tabelle 4.6:	DNA-Microarray-Analyse von CCCB und CCCB B2.....	85
Tabelle 4.7:	DNA-Microarray-Analyse von CCCB und CCCB O6 .....	86
Tabelle 4.8:	Vermittelte Resistenzerhöhung durch die Deletion von spr0683 und spr1851 im Vergleich zu R6 und CCCB .....	94
Tabelle 4.9:	Generationszeit der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851.....	97
Tabelle 4.10:	Der Effekt der <i>clpL</i> -Deletion auf die Generationszeit der spr0683- und spr1851-Deletionsderivate .....	106
Tabelle 7.1:	Transkriptionsanalyse von R6 Δspr0683 im Vergleich zum Wildtyp R6 ...	143
Tabelle 7.2:	Transkriptionsanalyse von R6 spr1851:: <i>janus</i> im Vergleich zum Wildtyp R6 .....	143

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid	RNA	Ribonukleinsäure
APS	Ammoniumpersulfat	RNase	Ribonuklease
AS	Aminosäure	rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
B	Benzylpenicillin, Penicillin	rRNA	ribosomale RNA
BAA	Bisacrylamid	S	sensitiv
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- Phosphat	s	Sekunden
bp	Basenpaar	SDS	Natriumdodecylsulfat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)	Sm	Streptomycin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
C	Cefotaxim	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
cDNA	komplementäre DNA	<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	Spc	Spectinomycin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	SSC	Saline Sodium Citrat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	TEMED	Tetramethylethylendiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
DNase	Desoxyribonuklease	tRNA	Transfer RNA
dNTP	Desoxyribonukleotidtri- phosphat	U	Unit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß		
EtOH	Ethanol		
g	Gramm		
GSH	Glutathion		
GST	Glutathion-S-Transferase		
h	Stunde		
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure		
IPTG	Isopropyl-β-D- Thiogalactopyranosid		
IS	Insertionssequenz		
Kan	Kanamycin		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
l	Liter		
min	Minuten		
MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure		
N	Nephelo		
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium- Chlorid		
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz- spektroskopie)		
nt	Nukleotid		
O	Oxacillin		
OD	optische Dichte		
PBP	Penicillin-bindendes Protein		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
R	resistent		

# 1 Zusammenfassung

Die weltweite Verbreitung Penicillin-resistenter Bakterienstämme, darunter auch *S. pneumoniae*, stellt ein erhebliches medizinisches Problem dar. Resistenzen gegen Antibiotika können mittels horizontalem Gentransfer zwischen verschiedenen Streptokokken-Spezies ausgetauscht und somit verbreitet werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig die Vorgänge bei der Entstehung und Ausbreitung der  $\beta$ -Lactamresistenz zu verstehen. Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse des horizontalen Gentransfers zwischen den beiden Spezies *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* und die daraus resultierende Entwicklung der  $\beta$ -Lactamresistenz.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die CCCB-Transformantenfamilie, welche durch die sukzessive Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA von *S. mitis* B6 und Selektion mit  $\beta$ -Lactamantibiotika generiert wurde. Dabei konnten bisher ungeklärte Faktoren der Resistenzentwicklung dieser Stämme identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eindeutig bewiesen, dass PBP2a in Kombination mit PBP2x aus *S. mitis* B6 einen entscheidenden Beitrag zur  $\beta$ -Lactamresistenz leistet.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Ursache des Resistenzunterschieds zwischen CCCB und CCCO. Diese zwei hochresistenten Stämme der vierten Transformationsstufe weisen scheinbar das gleiche Profil nieder-affiner Varianten aller fünf hochmolekularen PBP auf. Es konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass das *murM* Gen aus *S. mitis* B6 lediglich in CCCB ausgetauscht wurde. Weiterführende Experimente bestätigten, dass sowohl  $MurM_{B6}$  als auch  $MurM_{Hu17}$  aus einem resistenten *S. pneumoniae* Isolat, das über einen nahezu identischen Mosaikblock wie  $MurM_{B6}$  verfügt, erhöhte  $\beta$ -Lactamresistenz vermitteln. Das Mosaik- $MurM_{B6}$  trägt somit entscheidend zur höheren Resistenz von CCCB bei. Zudem wurde nachgewiesen, dass der Resistenzunterschied zwischen CCCB und CCCO zusätzlich durch die Anwesenheit des kompletten PBP2b<sub>B6</sub> in CCCB verursacht wird. Dabei konnte herausgestellt werden, dass die Aminosäuresubstitutionen des C-Terminus von PBP2b<sub>B6</sub>, die in CCCO nicht vorhanden sind, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von  $\beta$ -Lactamresistenz spielen.

---

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Identifizierung möglicher neuer Resistenzdeterminanten, welche von *S. mitis* B6 auf den bereits hochresistenten Stamm CCCB übertragen werden könnten. Durch die Transformation chromosomaler *S. mitis* B6 DNA in CCCB und Selektion mit diversen  $\beta$ -Lactamantibiotika konnten Stämme mit erhöhter  $\beta$ -Lactamresistenz isoliert werden. DNA-Microarray-Analysen dieser CCCB-Derivate dienten der Detektion möglicher übertragener Gene. Anstelle ausgetauschter, intakter Genloci zeigten diese Mutanten jedoch die Inaktivierung der Gene *spr0683* bzw. *spr1851*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der beobachtete Resistenzanstieg aus der Deletion dieser beiden Gene resultiert. Beide Gene kodieren für hypothetische Proteine mit potentiellen Nukleinsäure-bindenden R3H- bzw. KH-Domänen. Die genaue Funktion beider Domänen ist nicht bekannt. Transkriptionsanalysen der Deletionsderivate von *spr0683* und *spr1851* dienten als Screening-Methode für einen möglichen durch das Fehlen der Gene beeinflussten Effekt auf transkriptioneller Ebene. Die veränderte Genexpression einer möglichen Resistenzdeterminante (*ClpL*) deutete zunächst auf einen möglichen Zusammenhang mit den Resistenzphänotypen der Deletionsderivate hin. Weiterführende Versuche widerlegten dies jedoch. Zukünftige Untersuchungen müssten noch offene Fragen hinsichtlich der potentiellen Funktion der beiden hypothetischen Proteine klären.

## 2 Einleitung

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts war die Rolle von Bakterien als Krankheitserreger, unter anderem auch *Streptococcus pneumoniae*, zwar bekannt, doch es gab keine wirksame Behandlung gegen die oftmals tödlichen Infektionskrankheiten. Mit der zufälligen Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 durch Alexander Fleming und der nachfolgenden Verwendung als erstes Antibiotikum in den 1940er Jahren, gelang ein Durchbruch im Kampf gegen tödliche Infektionskrankheiten. Die Ära der Antibiotika hatte begonnen. Bereits wenige Jahre nach Beginn der Anwendung von  $\beta$ -Lactamantibiotika in den 1960er Jahren wurde das Auftreten resistenter Pneumokokken-Isolate in Boston, Australien und Papua Neuguinea beobachtet (Kislak *et al.*, 1965; Hansman *et al.*, 1974). Kurze Zeit darauf sorgte die Entdeckung hochresistenter Stämme, welche zusätzlich zur Penicillinresistenz Resistenzen gegen eine Vielzahl weiterer Antibiotika zeigten, für großes Aufsehen (Jacobs *et al.*, 1978). Seit diesem Zeitpunkt verbreiten sich multiresistente *S. pneumoniae* mit zunehmenden Resistenzniveaus weltweit (Appelbaum, 1987; Klugman und Koornhof, 1988; Klugman, 1990; Marton *et al.*, 1991).

In ihren natürlichen Habitaten, der Mundhöhle und dem oberen Respirationstrakt, sind sowohl pathogene als auch kommensale Streptokokken dem Selektionsdruck durch die Anwendung von Antibiotika ausgesetzt. Aufgrund ihrer Eigenschaft natürlich kompetent zu sein, können so entwickelte Resistenzen mittels horizontalem Gentransfer zwischen verschiedenen Streptokokken-Spezies ausgetauscht und verbreitet werden.

Im Hinblick dessen ist es wichtig, die Entstehung und Ausbreitung der  $\beta$ -Lactam-resistenz zu verstehen. Die vorliegende Arbeit analysiert den horizontalen Gentransfer zwischen *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* und die daraus resultierende Entwicklung der  $\beta$ -Lactamresistenz.

## 2.1 Die Gattung *Streptococcus*

*S. mitis* und *S. pneumoniae* zählen zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (ca. 40 %) und gehören der Gattung *Streptococcus* an. Die Morphologie der einzelnen Zellen zeichnet sich durch ihre kugelförmige bis ovoide Beschaffenheit aus. Diese sogenannten Kokken haben einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm und wachsen in kurzen Ketten oder als Diplokokken. Des Weiteren sind sie unbeweglich und sporulieren nicht. Bei Streptokokken handelt es sich um anaerobe, aber aerotolerante Milchsäurebakterien, die einen homofermentativen Stoffwechsel mit Milchsäure als Hauptprodukt aufweisen. Die komplexen Nährstoffanforderungen von Streptokokken umfassen neben einer Kohlenstoffquelle noch Vitamine, Aminosäuren, Peptide, Purine und Pyrimidine. In einem Festmedium muss zusätzlich Blut oder Serum enthalten sein (Hardie und Whiley, 1995). Anhand der vergrünenden  $\alpha$ -Hämolyse z. B. von *S. pneumoniae* und *S. mitis* auf diesen Blutagarplatten konnte Brown (1919) das Hämolyseverhalten als eine erste Differenzierungsmethode von Streptokokken etablieren. Während es sich bei der  $\beta$ -Hämolyse um eine vollständige Lyse der Erythrozyten durch das vorhandene Streptolysin und die daraus resultierende Ausbildung eines klaren Hemmhofs um die Bakterienkolonien von beispielsweise *S. pyogenes* handelt, ist die Vergrünung bei der  $\alpha$ -Hämolyse auf die Entfärbung der Erythrozyten zurückzuführen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Spezies *S. pneumoniae* und *S. mitis* wurden aufgrund von molekularbiologischen Methoden wie der 16S rRNA-Sequenzanalyse oder MLST (**M**ulti **l**ocus **s**equencing **t**yping) als gemeinsame Vertreter der Mitis-Gruppe identifiziert (Kawamura *et al.*, 1995; Chi *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 2008). Beide Bakterienarten besiedeln die menschliche Mundhöhle und den oberen Respirationstrakt. Während *S. mitis* als Kommensaler Teil der normalen Mundflora ist, handelt es sich bei *S. pneumoniae* um ein meist asymptomatisch auftretendes Bakterium, welches allerdings z. B. im Falle eines geschwächten Immunsystems als opportunistisches Pathogen auftreten kann.

### 2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae*, auch als Pneumokokkus bekannt, konnte bereits 1880 von Sternberg und Pasteur unabhängig voneinander isoliert werden (Pasteur, 1881;

Sternberg, 1881). Der ursprüngliche Name *Diplococcus pneumoniae* ist auf das beobachtete Wachstum als diploide Kokken zurückzuführen. Inzwischen sind 91 Serotypen von *S. pneumoniae* bekannt, die aufgrund der Zusammensetzung ihrer Kapselpolysaccharide unterschieden werden (Henrichsen, 1995; Park *et al.*, 2007). Das Vorhandensein einer Polysaccharidkapsel stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar, indem sie das Bakterium vor der Phagozytose durch Makrophagen des Wirts schützt. Weitere Virulenzfaktoren sind unter anderem die Hyaluronidase (Hyl), das Autolysin LytA, das Cholinbindeprotein CbpA sowie das Cytolysin Pneumolysin (Ply) (Jedrzejak, 2001). Aufgrund solcher Virulenzfaktoren besitzt *S. pneumoniae* ein hohes Pathogenitätspotential und ist laut der Weltgesundheitsorganisation jährlich für 1,6 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich (WHO, Stand 2005). Zudem ist die durch *S. pneumoniae* ausgelöste Lungenentzündung (Pneumonie) die häufigste Todesursache von Kindern. Des Weiteren kann dieses Pathogen Krankheiten wie Mittelohrentzündung (Otitis media), Hirnhautentzündung (Meningitis), Herzmuskelentzündung (Endocarditis) und Bakteriämie verursachen (Mitchell, 2003).

### 2.1.2 ***Streptococcus mitis***

Wie zuvor erwähnt zählt *S. mitis* zu den Kommensalen. Dennoch wird dieses Bakterium immer häufiger als Verursacher von Endocarditis und Bakteriämie identifiziert (Mitchell, 2011). *S. mitis* verfügt über ein ähnliches Set an Virulenzfaktoren wie Pneumokokken. Allerdings zeigte das erst kürzlich sequenzierte Genom von *S. mitis* B6, eines hoch penicillin- und multipel antibiotika-resistenten Vertreters dieser Art (König *et al.*, 1998), einige relevante Unterschiede (Denapaita *et al.*, 2010). Beispielsweise fehlt diesem Stamm das Gencluster einer Polysaccharidkapsel, welche für die Pathogenität von *S. pneumoniae* entscheidend ist. Weltweit wurden resistente *S. mitis*-Stämme vor allem in Ländern isoliert, die einen hohen Prozentsatz an penicillin-resistenten *S. pneumoniae*-Isolaten aufweisen (Potgieter *et al.*, 1992a; Carratalá *et al.*, 1995).

Ein Vergleich von *S. mitis* und *S. pneumoniae* auf der Basis von 16S rRNA-Sequenzanalysen zeigte eine 99 %-ige Identität (Kawamura *et al.*, 1995). Des Weiteren zeigten vergleichende genomische Hybridisierungen (Hakenbeck *et al.*, 2001) und MLST-Analysen (Chi *et al.*, 2007), dass *S. mitis* genetisch der nächste Verwandte von *S. pneumoniae* ist. Ein genomischer Vergleich mithilfe von DNA-

Microarrays sowie *in silico* Analysen auf Proteinebene lieferten zudem die Erkenntnis, dass 81 % der *S. mitis* B6 Genprodukte Homologe in *S. pneumoniae* aufweisen (Denapaite *et al.*, 2010). Daher ist es nicht verwunderlich, dass mittels horizontalem Gentransfer ein reger Austausch von genetischem Material zwischen diesen Spezies stattfinden kann.

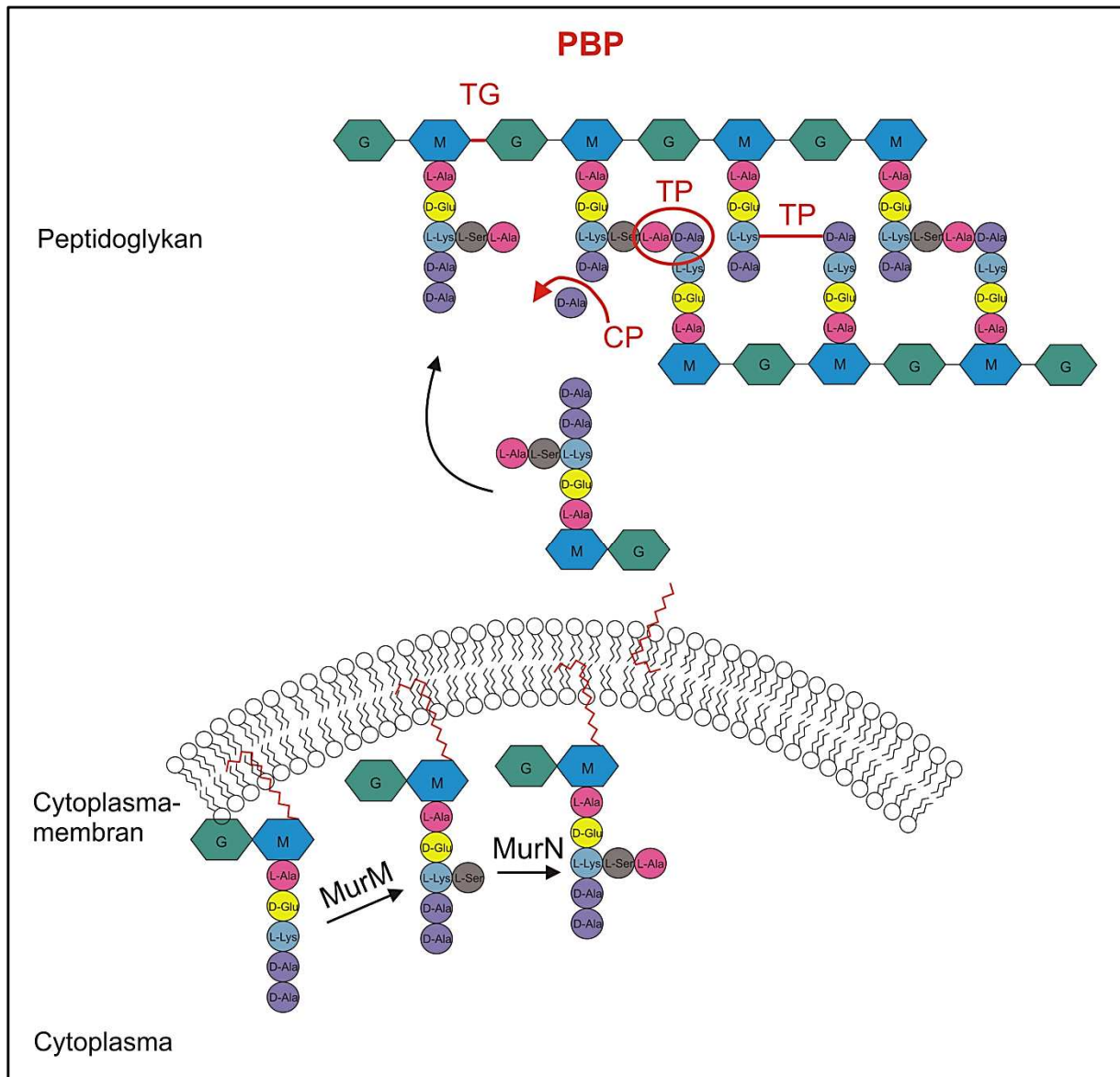
## 2.2 Peptidoglykanbiosynthese – MurM und Penicillin-bindende Proteine (PBP)

Der Hauptbestandteil der Zellwand, die dem Bakterium Stabilität, Schutz und Form verleiht, ist das Peptidoglykan oder Murein. Dieses Makromolekül besteht in Pneumokokken und den meisten Eubakterien aus den alternierend  $\beta$ -1,4-verknüpften Zuckerderivaten N-Acetylglukosamin (G) und N-Acetylmuraminsäure (M) (Vollmer, 2007). Die endgültige Stabilität des Peptidoglykans wird erst durch eine zusätzliche Querverknüpfung zweier Peptidketten, welche an die N-Acetylmuraminsäure gebunden sind, erreicht. Diese Quervernetzung wird von den Penicillin-bindenden Proteinen, den PBP katalysiert. Bei *S. pneumoniae* besteht das Pentapeptid aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamat, L-Lysin und zwei D-Alanin-Molekülen. Die Pentapeptide von zwei Mureinsträngen können dabei direkt über eine Peptidbindung des L-Lysins an dritter Stelle des einen Stranges mit dem D-Alanin an vierter Position des zweiten Stranges quervernetzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Quervernetzung über eine Interpeptidbrücke zwischen diesen beiden Aminosäuren. Im Falle von *S. pneumoniae* besteht diese entweder aus zwei L-Alanin-Molekülen oder aus L-Serin und L-Alanin (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Dabei wird die Bindung der ersten Aminosäure durch das Enzym MurM katalysiert, während MurN für die Verknüpfung der zweiten Aminosäure verantwortlich ist (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Die Energie für diese Querverknüpfung stammt aus der Abspaltung des endständigen D-Alanins an fünfter Position des Pentapeptids (s. Abbildung 2.1). Der Grad der Quervernetzung variiert bei diversen Pneumokokken-Spezies beträchtlich, wobei bereits gezeigt wurde, dass resistente Pneumokokken ein hohes Maß an verzweigtem Peptidoglykan aufweisen (Garcia-Bustos *et al.*, 1988; Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996).



Die Peptidoglykanbiosynthese von *S. pneumoniae* lässt sich generell in drei Abschnitte gliedern, welche in verschiedenen Kompartimenten der Zelle stattfinden (Vollmer, 2007). Zunächst wird im Cytoplasma in einer Reihe von Reaktionen, die durch die Enzyme MurA bis MurF katalysiert werden, aus UDP-N-Acetylglukosamin das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid gebildet. Dabei sind die ATP-abhängigen Aminosäure-Ligasen MurC bis MurF für die Entstehung des Pentapeptids verantwortlich. Im zweiten Abschnitt wird das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid mithilfe der Translokase MraY unter Freisetzung von UMP auf den membran-gebundenen Lipidcarrier Undecaprenylpyrophosphat transferiert. Das entstandene Molekül, das als Lipid I bezeichnet wird, ist an die Cytoplasmamembran gebunden und wird dort durch eine von MurG katalysierte Reaktion mit UDP-N-Acetylglukosamin glykosyliert. Auf die Bildung von Lipid II folgt nun gegebenenfalls die Synthese der Interpeptidbrücke durch die Enzyme MurM und MurN, welche als Aminoacyl-Ligasen fungieren (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2008; De Pascale *et al.*, 2008). Diese auch als FibA bzw. FibB benannten Enzyme werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich als MurM und MurN bezeichnet. Die erste Aminosäure der Interpeptidbrücke, L-Alanin oder L-Serin, wird durch die Beteiligung von MurM von einer tRNA ausgehend an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von L-Lysin an dritter Position des Pentapeptids transferiert (Lloyd *et al.*, 2008). Filipe *et al.* (2001) zeigten, dass ein Sequenzblock zwischen den Aminosäuren 244 und 274 für die Spezifität der MurM-katalysierten Reaktion verantwortlich ist und über die Anheftung von L-Alanin oder L-Serin entscheidet. Auch MurN benötigt als Substrat eine tRNA mit gebundenem L-Alanin für den Transfer dieser Aminosäure an LipidII-L-Serin oder Lipid II-L-Alanin (De Pascale *et al.*, 2008). Abbildung 2.1 zeigt schematisch, beginnend mit Lipid II, die späten Schritte der Peptidoglykanbiosynthese, an denen unter anderem das Enzym MurM und die Penicillin-bindenden Proteine beteiligt sind. Der Peptidoglykan-Vorläufer, bestehend aus Lipid II und der Interpeptidbrücke, wird im nächsten Schritt mithilfe des gebundenen Undecaprenylpyrophosphats durch die Membran transloziert. Dies geschieht vermutlich durch eine Flippase. Nach Abspaltung des Lipidcarriers werden die Zuckerderivate des Peptidoglykan-Vorläufers durch eine Transglykosylierungsreaktion in die bestehende Glykankette eingebaut. Die folgende Quervernetzung der Peptide benachbarter Stränge, auch Transpeptidierung genannt, führt zu einer größeren Stabilität der Zellwand. Schließlich wird das endständige D-Alanin des Pentapeptids durch eine

D,D-Carboxypeptidasereaktion abgespalten. Diese letzten drei Reaktionen der Peptidoglykanbiosynthese werden von den PBP katalysiert (Sauvage *et al.*, 2008).



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung später Schritte der Peptidoglykanbiosynthese in *S. pneumoniae***

Im Cytoplasma wird Lipid II gebildet, das aus den Zuckerderivaten (Hexagone) N-Acetylglucosamin (G) und N-Acetylmuraminsäure (M) mit der Pentapeptidkette besteht. Nach dem Anheften der Interpeptidbrücke durch MurM und MurN wird der Peptidoglykan-Vorläufer durch die Cytoplasmamembran transloziert. Der Einbau in die bestehende Peptidoglykanschicht wird durch die von den PBP katalysierten Reaktionen (rot) Transglykosylierung (TG), Transpeptidierung (TP) und D,D-Carboxypeptidierung (CP) ermöglicht.

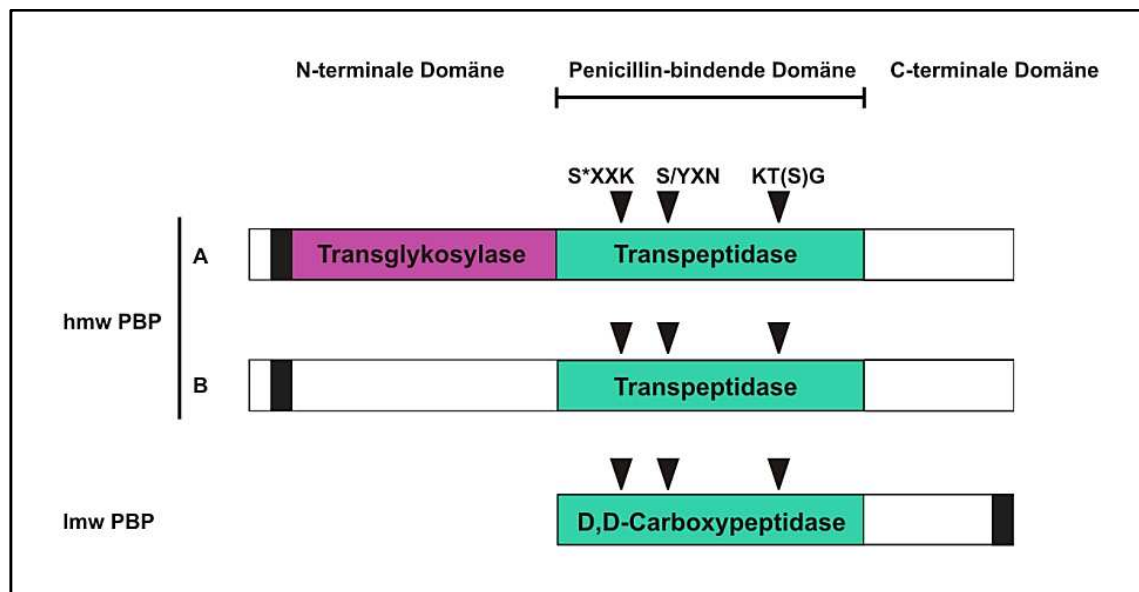
Alle Bakterien, die eine Zellwand besitzen, verfügen auch über membranassoziierte PBP, wobei jede Spezies ein charakteristisches Set aufweist. Allen PBP ist die Penicillin-bindende Domäne mit ihren drei konservierten Motiven gemein: S\*XXK mit dem aktiven Serin (S\*), S/YXN und KT(S)G (X = variable Aminosäure). Diese Motive

sind auch bei den  $\beta$ -Lactamasen vorhanden, welche zusammen mit den PBP zur Familie der Acyl-Serin-Transferasen gehören (Ghuysen, 1991). Aufgrund ihres Molekulargewichtes werden PBP in hochmolekulare (hmw = **high molecular weight**) und niedermolekulare (lmw = **low molecular weight**) PBP eingeteilt.

Die Topologie der hmw PBP besteht im Allgemeinen aus einem kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Ende, gefolgt von einem hydrophoben Transmembrananker und den extrazellulären Domänen. Dabei handelt es sich neben der Penicillin-bindenden Domäne in einigen Fällen noch um eine variable Domäne, die am C-Terminus lokalisiert ist. Abhängig von der Struktur und der katalytischen Aktivität der N-terminalen Domäne werden die hmw PBP zusätzlich in Klasse A und B unterteilt (Goffin und Ghuysen, 1998; Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008). Beiden Klassen ist die Penicillin-bindende Domäne gemein, welche den PBP die Transpeptidase-Aktivität verleiht. Während Klasse B PBP monofunktionale Enzyme mit Transpeptidase-Aktivität sind, besitzen die bifunktionalen PBP der Klasse A zusätzlich eine N-terminal lokalisierte Domäne mit Transglykosylase-Aktivität. Der N-Terminus der Klasse B PBP verfügt dagegen über eine Domäne unbekannter Funktion.

Während die Penicillin-bindende Domäne der hmw PBP als Transpeptidase fungiert, ist diese Domäne bei den lmw PBP für die D,D-Carboxypeptidierung verantwortlich. Dabei wird durch die Abspaltung des endständigen D-Alanins das Donorpeptid für die Transpeptidierung limitiert. Die Carboxypeptidase ist somit indirekt für den Grad der Quervernetzung des Peptidoglykans verantwortlich (Severin *et al.*, 1992; Morlot *et al.*, 2004). Ein weiterer Unterschied zwischen den hoch- und niedermolekularen PBP besteht in der Assoziation mit der Cytoplasmamembran. Die lmw PBP verfügen nicht über einen Transmembrananker, sondern sind durch eine amphiphile C-terminale Helix mit der Membran assoziiert.

*Streptococcus pneumoniae* besitzt sechs PBP (Hakenbeck *et al.*, 1986). Der schematische Aufbau der hmw PBP der Klasse A und B sowie des lmw PBP sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Zu den bifunktionalen hmw PBP der Klasse A gehören PBP1a (79,7 kDa), PBP1b (89,5 kDa) und PBP2a (80,8 kDa). Die monofunktionalen hmw PBP der Klasse B sind PBP2x (82,3 kDa) und PBP2b (74,5 kDa). PBP3 ist mit 45,2 kDa das einzige lmw PBP von *S. pneumoniae*.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der PBP aus *S. pneumoniae***

Gezeigt ist der schematische Aufbau der hochmolekularen (hmw) PBP der Klassen A und B sowie das niedermolekulare (lmw) PBP aus *S. pneumoniae*. Die drei konservierten Motive (schwarze Dreiecke) befinden sich in allen Penicillin-bindenden Domänen (grün) unabhängig von der katalytischen Aktivität als Transpeptidase oder D,D-Carboxypeptidase. Die Transglykosylase-Aktivität der Klasse A hmw PBP ist in lila gezeigt. Der Transmembrananker der hmw PBP bzw. die amphiphile Helix des lmw PBP sind als schwarze Blöcke gekennzeichnet. Das hmw PBP2b besitzt keine C-terminale Domäne. Das aktive Serin ist mit einem Stern (\*) markiert und X steht für variable Aminosäuren (nach Hakenbeck, 1998).

Wie in Abschnitt 2.1.2 bereits beschrieben wurde, handelt es sich bei *S. mitis* B6 um einen nahen Verwandten von *S. pneumoniae*. Dies zeigt sich auch anhand der sechs PBP von *S. mitis* B6. Bei den PBP handelt es sich um fünf hmw PBP und das lmw PBP3 (45,2 kDa). Die bifunktionalen hmw PBP der Klasse A sind PBP1a (80,7 kDa), PBP2a (80,7 kDa) und PBP1b (61,88 kDa). Die Besonderheit von PBP1b<sub>B6</sub> ist ein Stoppcodon in der Transpeptidase-Domäne an Position 567 (Denapaite *et al.*, 2010). Es wurde bereits gezeigt, dass PBP1b unter Laborbedingungen deletiert werden kann (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999), zudem ist die Transpeptidase-Aktivität dieses PBP *in vivo* offensichtlich entbehrlich. Zu den monofunktionalen hmw PBP der Klasse B von *S. mitis* B6 zählen PBP2x (82,6 kDa) und PBP2b (74,4 kDa). Die Gene aller sechs PBP zeigen eine Homologie zu den *pbp* Genen sensitiver *S. pneumoniae*-Stämme. Dabei weisen *pbp1a* und *pbp2b* aus *S. mitis* B6 eine Mosaikstruktur auf, deren Blöcke sich in 3-29 % zu *S. pneumoniae* unterscheiden. Die Gene *pbp2x* und *pbp1b* zeigen einen Sequenzunterschied zwischen 19-25 %, und *pbp3* unterscheidet sich in 2-10 % (Denapaite *et al.*, 2010). Das *pbp2a* Gen ist sehr homolog und unterscheidet sich von *pbp2a* aus *S. pneumoniae* R6 nur zu 6 %

(Hakenbeck *et al.*, 1998). Eine weitere Besonderheit weist *S. mitis* B6 PBP2a auf, das durch die Insertion eines IS-Elements am C-Terminus zwei zusätzliche Aminosäuren enthält (Denapate *et al.*, 2010). Eine Beeinflussung der Funktionalität dieses Proteins ist jedoch unwahrscheinlich.

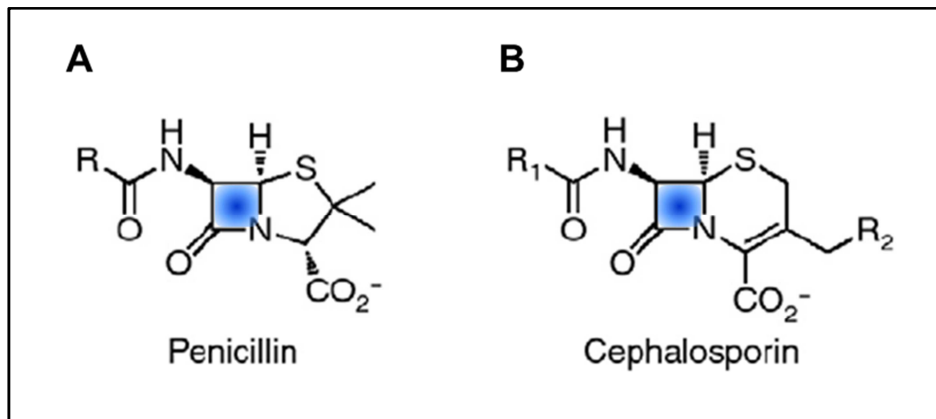
Die genauen *in vivo* Funktionen der einzelnen PBP sind noch weitestgehend ungeklärt. Die Kristallstrukturen sowie Lokalisations- und Deletionsstudien sollten dabei helfen, ein besseres Verständnis der individuellen PBP-Funktionen zu erlangen. Mittlerweile konnten abgesehen von PBP2a die Kristallstrukturen aller anderen *S. pneumoniae* PBP ermittelt werden (Pares *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2005; Morlot *et al.*, 2005; Contreras-Martel *et al.*, 2006; Contreras-Martel *et al.*, 2009). Anhand von Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass alle PBP am Septum lokalisiert sind (Zapun *et al.*, 2008). Eine Hypothese beruht dabei auf der Vorstellung von zwei unabhängigen Wegen der Peptidoglykansynthese, einerseits für das periphere und andererseits für das septale Zellwandwachstum (Zapun *et al.*, 2008). Anhand von Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass PBP2x und PBP2b in *S. pneumoniae* essentiell sind (Kell *et al.*, 1993), wohingegen alle hmw PBP der Klasse A, PBP1a, PBP1b und PBP2a, einzeln inaktiviert werden können (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). Doppeldeletionen von PBP1a/1b, bzw. PBP1b/2a konnten isoliert werden, zeigten allerdings erhebliche Defekte bei der Septumbildung und eine verfrühte Lyse. Eine gleichzeitige Inaktivierung von PBP1a/2a konnte nicht hergestellt werden (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). Das lmw PBP3 ist nicht essentiell, allerdings zeigten Deletionsderivate eine multiple Septenbildung über die gesamte Zelle verteilt sowie auffällig verdickte Zellwände (Schuster *et al.*, 1990). PBP3 scheint für die Organisation des Wachstums- und Teilungsprozesses verantwortlich zu sein (Schuster *et al.*, 1990; Morlot *et al.*, 2004).

## 2.3 $\beta$ -Lactamresistenz in *Streptococcus pneumoniae*

Die Zellwand, die dem Bakterium Stabilität und Schutz verleiht, ist der zentrale Prokaryoten-spezifische Angriffspunkt für eine Reihe von Antibiotika. Hierzu zählen auch die  $\beta$ -Lactame, wie z. B. Penicillin, die aufgrund der Inhibierung ihrer Zielenzyme, der PBP, bakterizid und bakteriolytisch auf wachsende Zellen wirken. Seit Beginn der Penicillin-Anwendung haben Bakterien drei Mechanismen zum Schutz vor  $\beta$ -Lactamantibiotika entwickelt. Zum einen führt sowohl die Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran als auch ein aktiver Export der  $\beta$ -Lactame dazu, dass diese ihre Zielenzyme nicht erreichen können, wobei dies ausschließlich auf Gram-negative Bakterien zutrifft. Darüber hinaus hat die Aktivität von  $\beta$ -Lactamasen eine hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Lactamrings und somit die Inaktivierung des Antibiotikums zur Folge. Ein weiterer Mechanismus ist die Veränderung der Zielenzyme, d. h. der PBP. Diese Modifikationen resultieren in einer Affinitätserniedrigung gegenüber  $\beta$ -Lactamen und führen so, unter anderem auch in *S. pneumoniae*, zur  $\beta$ -Lactamresistenz.

### 2.3.1 $\beta$ -Lactamantibiotika

Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums kommen  $\beta$ -Lactame bei einer Vielzahl von Infektionskrankheiten zum Einsatz.  $\beta$ -Lactame werden unter anderem von Schimmelpilzen der Gattungen *Penicillium*, *Cephalosporium* und *Aspergillus* sowie einigen Prokaryoten gebildet. Zusätzlich können sie synthetisch und semi-synthetisch hergestellt werden. Zu den  $\beta$ -Lactamantibiotika zählt man die Penicilline, Cephalosporine, Monobactame, Carbapeneme und  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren. Allen  $\beta$ -Lactamen ist der viergliedrige, sogenannte  $\beta$ -Lactamring gemein. Abbildung 2.3 zeigt die Grundstruktur der Penicilline und Cephalosporine. Während bei Penicillinen ein fünfgliedriger Thiazolidinring an den  $\beta$ -Lactamring gebunden ist, findet sich bei den Cephalosporinen an dieser Stelle ein sechsgliedriger Dihydrothiazinring. Diese Grundgerüste sind durch variable Acylseitenketten komplettiert.



**Abbildung 2.3: Grundstruktur der Penicilline und Cephalosporine**

Der  $\beta$ -Lactamring der Penicilline (A) und Cephalosporine (B) ist blau markiert. R steht für die variablen Acylseitenketten (nach Llarrull *et al.*, 2010).

Die Wirkung der  $\beta$ -Lactame beruht auf der Inhibierung der Zellwandbiosynthese, indem sie die Transpeptidierungs- und Carboxypeptidierungsreaktion der PBP inaktivieren. Aufgrund der Strukturanalogie des Antibiotikums zum D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Mureinpentapeptids, dem eigentlichen Substrat der PBP, bindet das  $\beta$ -Lactam unter Öffnung des  $\beta$ -Lactamrings kovalent an den Hydroxylrest des aktiven Serins im katalytischen Zentrum der Penicillin-bindenden Domäne und inhibiert somit deren Funktion. Auf diese Weise entsteht ein stabiler Penicilloyl-Komplex in dem das PBP inaktiv vorliegt und dadurch nicht mehr für die Peptidoglykanbiosynthese zur Verfügung steht (Tipper und Strominger, 1965). Die Zellwand wird kontinuierlich weiter synthetisiert, verliert allerdings aufgrund der fehlenden Quervernetzung an Stabilität. Zudem werden Autolysine freigesetzt, die die Zellwand zusätzlich schwächen (Tomasz, 1979). Dies führt letztendlich zur Lyse der Bakterienzelle, die dem osmotischen Druck nicht mehr standhalten kann.

### 2.3.2 PBP-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz in *S. pneumoniae*

Die  $\beta$ -Lactamresistenz in *S. pneumoniae* beruht vor allem auf Modifikationen der Zielenzyme, der PBP, wie bereits in Abschnitt 2.3 erwähnt. Diese Veränderungen befinden sich in der Transpeptidase-Domäne und verringern die Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamen (Hakenbeck *et al.*, 1999). Während resistente Labormutanten einzelne Punktmutationen in den PBP Genen aufweisen (Laible und Hakenbeck, 1991; Hakenbeck *et al.*, 1994; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauss *et al.*, 1996; Krauss

und Hakenbeck, 1997), sind nieder-affine PBP aus klinischen Isolaten das Produkt sogenannter Mosaikgene. Dabei handelt es sich um Gene, die Regionen unterschiedlicher Länge durch homologe Sequenzen ersetzt haben, welche sich in ca. 20 % der DNA-Sequenz unterscheiden. Dies resultiert in einem ca. 10 %-igen Unterschied auf Aminosäureebene und konnte bereits für PBP2b, PBP2x und PBP1a gezeigt werden (Dowson *et al.*, 1989; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992). In verschiedenen Labormutanten und klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* konnten niedrig-affine Varianten von allen sechs PBP detektiert werden. Die wesentlichen PBP sind dabei PBP2x, 2b und 1a. PBP2x und PBP2b stellen primäre Ziele der  $\beta$ -Lactame dar. Modifikationen dieser Proteine vermitteln nur eine geringe Resistenz, sind allerdings Voraussetzung für die Entstehung hochresistenter Stämme durch zusätzliche Veränderungen anderer PBP (Grebe und Hakenbeck, 1996), unter anderem zeigten Muñoz *et al.* (1992) dies für PBP1a in klinischen Isolaten. Bislang wurden zwar niedrig-affine Varianten von PBP2a in Zusammenhang mit niedrig-affinem PBP2x in Labormutanten und klinischen Isolaten (Reichmann *et al.*, 1996; Du Plessis *et al.*, 2000; Sanbongi *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005) beschrieben, allerdings ist die Rolle von PBP2a bei der  $\beta$ -Lactamresistenz noch weitestgehend unklar. Modifikationen von PBP1b konnten in hochresistenten *S. pneumoniae*-Stämmen nicht identifiziert werden (Du Plessis *et al.*, 2000; Sanbongi *et al.*, 2004). Des Weiteren ist noch unklar, ob PBP1b<sub>B6</sub>, welches keine funktionale Transpeptidase-Domäne besitzt, einen Vorteil im Zusammenhang mit weiteren veränderten PBP vermittelt (Prutscher, 2008).

### 2.3.3 Nicht-PBP-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz in *S. pneumoniae*

Neben der PBP-vermittelten  $\beta$ -Lactamresistenz konnten in Labormutanten von *S. pneumoniae* auch nicht-PBP-Resistenzdeterminanten identifiziert werden (Hakenbeck *et al.*, 1999). Mutationen in den Genen *ciaH* und *cpoA* führten sowohl zu erhöhter Resistenz gegen  $\beta$ -Lactame, als auch zu einer Reduktion der natürlichen Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994; Grebe *et al.*, 1997). Die Mutationen in der Glycosyltransferase CpoA, welche mit Piperacillin selektioniert wurden, resultierten zusätzlich in einer Reduktion der PBP1a-Menge. Veränderungen in der Histidinkinase CiaH des Zweikomponentensystems CiaRH wurden mit Cefotaxim und Piperacillin selektioniert. Die Aminosäure-Ligase MurE, welche an der Peptidoglykan-



biosynthese beteiligt ist, konnte vor kurzem als neue Resistenzdeterminante identifiziert werden (Todorova, 2010).

Das Enzym MurM, welches die Anheftung der ersten Aminosäure der Interpeptidbrücke katalysiert, ist als einzige nicht-PBP-Resistenzdeterminante in klinischen Isolaten bekannt (Filipe und Tomasz, 2000; Smith und Klugman, 2001). Auch *murM* Gene resistenter klinischer Isolate weisen Mosaikstrukturen auf und treten in Kombination mit modifizierten PBP auf (Smith und Klugman, 2001; Filipe *et al.*, 2001; Cafini *et al.*, 2006). Die Deletion von *murM* führt trotz der Anwesenheit niedrig-affiner PBP zu einem sensitiven Phänotyp (Weber *et al.*, 2000; Filipe und Tomasz, 2000). Der Grund für diesen Zusammenbruch der Resistenz ist bislang ungeklärt.

## **2.4 Entwicklung und Ausbreitung der $\beta$ -Lactamresistenz in *Streptococcus pneumoniae***

Zur Entstehung und Verbreitung von Mosaikgenen tragen sowohl Transformations- und Rekombinationsereignisse zwischen Stämmen innerhalb einer Art bei (intra-Spezies) als auch der horizontale Gentransfer zwischen Stämmen verschiedener Arten (inter-Spezies). Diese Fähigkeit Erbinformationen zu übermitteln wird als Transformation bezeichnet und wurde bereits 1928 bei *S. pneumoniae* nachgewiesen (Griffith, 1928). Einige Jahre später identifizierten Avery *et al.* (1944) die DNA als das „transformierende Prinzip“. Der Zustand, der es den Bakterien ermöglicht DNA aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet und tritt bei *S. pneumoniae* zumeist in der frühen exponentiellen Wachstumsphase auf. Die exakte Zeitspanne ist dabei Medien- und Stamm-spezifisch.

Die genetische Kompetenz ist eine machtvolle Eigenschaft für die Aufnahme und die Integration von Resistenzdeterminanten und spielt auch bei der Entwicklung von  $\beta$ -Lactamresistenz in *S. pneumoniae* eine bedeutende Rolle.

### 2.4.1 Natürliche Kompetenz in *S. pneumoniae*

Die natürliche Kompetenz in *S. pneumoniae* wird über einen CSP-vermittelten (competence stimulating peptide) Quorum-Sensing-Mechanismus reguliert (Håvarstein *et al.*, 1995). An dieser Regulation sind die Genprodukte des *comAB*- und *comCDE*-Operons beteiligt. Das Genprodukt von *comC* wird durch ComAB prozessiert und sekretiert. Sobald eine kritische extrazelluläre Konzentration des auf diese Weise entstandenen CSP erreicht ist, bindet dieses Peptid an die Histidinkinase ComD des Zweikomponentensystems, die wiederum den Responseregulator ComE phosphoryliert und somit aktiviert. ComE reguliert die Expression der frühen Kompetenzgene (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). Hierzu zählen unter anderem *comCDE* selbst, was zu einer autokatalytischen Verstärkung der Regulation führt. Auch die Gene *comX1* und *comX2*, die für einen alternativen Sigma-Faktor ComX kodieren, gehören zu den frühen Kompetenzgenen (Lee und Morrison, 1999). ComX wiederum induziert die Expression der späten Kompetenzgene, unter anderem auch Gene, deren Produkte an der Transformation, Stressantwort und Lyse beteiligt sind (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).

### 2.4.2 Ausbreitung der $\beta$ -Lactamresistenz durch horizontalen Gentransfer

Wie in Abschnitt 2.3.2 bereits beschrieben wurde, konnten im Zuge des horizontalen Gentransfers zwischen *S. pneumoniae* und verwandten kommensalen Streptokokken *pbp*-Mosaikgene entstehen, die zu niedrig-affinen PBP-Varianten führen (Dowson *et al.*, 1989; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992). Vermutlich sind zunächst Punktmutationen in *pbp* Genen sensitiver kommensaler Streptokokken entstanden, bevor resistenzrelevante Mosaikblöcke mittels horizontalem Gentransfer in Pneumokokken übertragen wurden (Reichmann *et al.*, 1997). Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass Sequenzen von *pbp* Genen aus sensitiven *S. mitis* und *S. oralis* eine hohe Ähnlichkeit zu Mosaikblöcken in resistenten *S. pneumoniae* aufweisen (Dowson *et al.*, 1993; Sibold *et al.*, 1994). Das Vorkommen identischer *pbp*-Mosaikgene in verschiedenen *S. pneumoniae*-Klonen zeigt, dass auch der Gentransfer innerhalb einer Spezies für die Ausbreitung der  $\beta$ -Lactamresistenz von Bedeutung ist (Coffey *et al.*, 1991). Zusätzliche Hinweise auf einen regen Austausch genetischen

Materials durch interspezifischen Gentransfer lieferte die Identifizierung ähnlicher Sequenzen von *pbp*-Mosaikgenen resistenter *S. pneumoniae* zu *pbp* Genen sowohl aus sensitiven als auch resistenten *S. sanguis*, *S. oralis* und *S. mitis* (Dowson *et al.*, 1990; Coffey *et al.*, 1993; Potgieter und Chalkley, 1995). *S. mitis* kann nicht nur als Donor von Resistenzgenen für *S. pneumoniae* auftreten, sondern auch Resistenzdeterminanten von benachbarten oralen Bakterien erwerben (Potgieter *et al.*, 1992b; Hannan *et al.*, 2010; Mitchell, 2011).

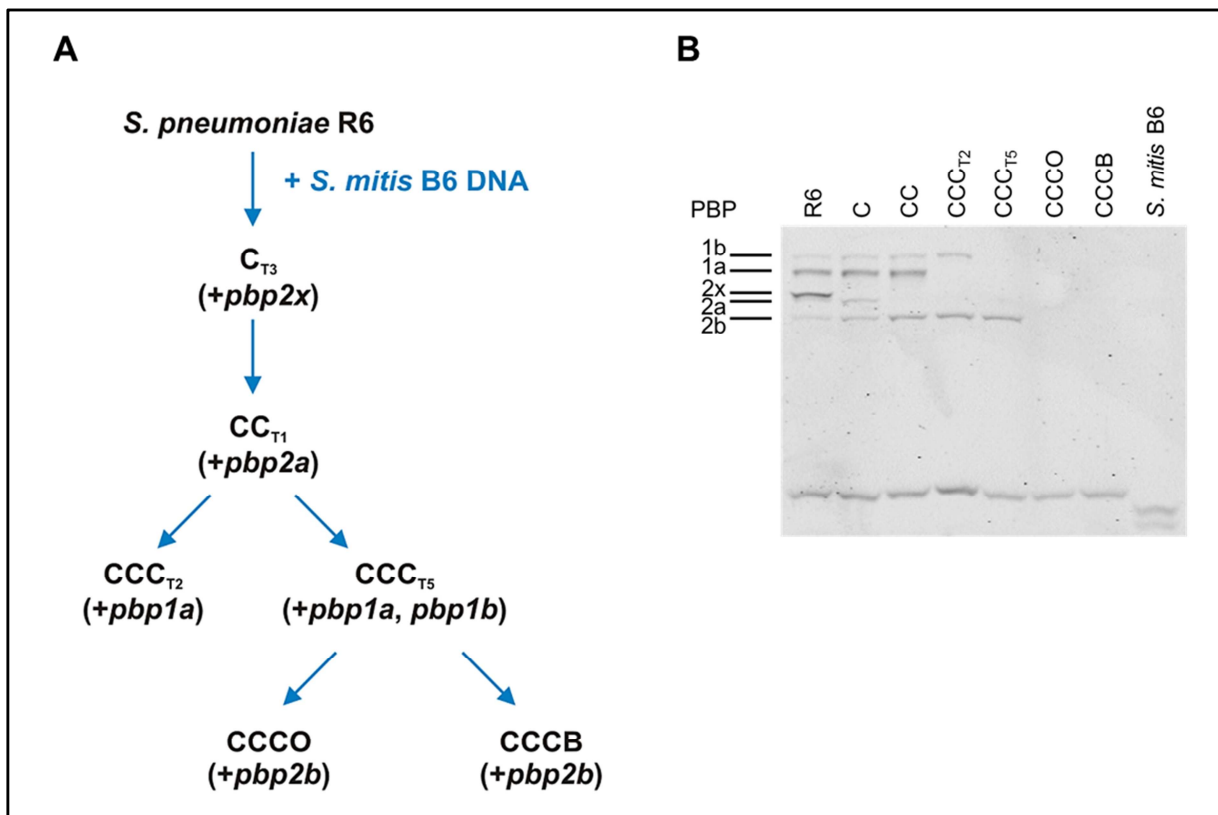
In ihrem natürlichen Habitat, der Mundhöhle und dem oberen Respirationstrakt, leben Streptokokken verschiedener Spezies in enger Nachbarschaft. Dadurch wird der Austausch homologer Sequenzbereiche mittels horizontalem Gentransfer, z. B. zwischen *S. mitis* und *S. pneumoniae*, ermöglicht und gleichzeitig ein globaler Genpool von Resistenzdeterminanten geschaffen.

### 2.4.3 Die CCCB-Transformantenfamilie

Der horizontale Gentransfer nieder-affiner PBP-Varianten zwischen *S. mitis* und *S. pneumoniae* konnte bereits in mehreren Fällen nachgewiesen werden (Chalkley *et al.*, 1991; Reichmann *et al.*, 1997; Hakenbeck *et al.*, 1998). Aus klinischer Sicht stellt dieser Austausch von Resistenzdeterminanten ein großes Problem dar. So resultiert der Transfer von *pbp*-Mosaikgenen und anderen Resistenzgenen zumeist in hoch penicillin- bzw. multipel Antibiotika-resistenten Stämmen. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig das Potential des Resistenztransfers von *S. mitis* und *S. pneumoniae* zu untersuchen.

Hakenbeck *et al.* (1998) wiesen die Übertragung aller fünf niedrig-affinen hochmolekularen PBP aus dem  $\beta$ -Lactam-resistenten *S. mitis* B6 auf den sensitiven *S. pneumoniae* R6 nach. In vier aufeinanderfolgenden Transformationsschritten von *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA von *S. mitis* B6 und Selektion auf steigenden Antibiotikakonzentrationen entstanden Mutanten, bei denen sukzessive PBP ausgetauscht worden waren. Die Namensgebung beruht dabei auf den entsprechenden Selektionsantibiotika. Diese Transformanten stellten die Ausgangsbasis für die vorliegende Arbeit. Abbildung 2.4 zeigt eine Übersicht dieser Transformantenfamilie (A) sowie deren PBP-Profile (B). Die Markierung der PBP erfolgte mit Bocillin, einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat (Zhao *et al.*, 1999) und anschließender Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE. Nieder-affine

Varianten sind dabei aufgrund der verringerten Affinität zu Bocillin nicht oder nur bedingt sichtbar.



**Abbildung 2.4: Die CCCB-Transformantenfamilie und deren PBP-Profile**

Gezeigt ist eine Übersicht über die Transformantenfamilie ausgehend vom sensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6 (A). In vier Transformations- und Selektionsschritten mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA (blau) wurden sukzessive alle fünf hmw PBP verändert, wobei das hinzukommende Gen jeden Schrittes in Klammern gezeigt ist. Die PBP-Profile (B) sind anhand der Bocillinmarkierung und Auftrennung mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.21 und 3.19) sichtbar.

Durch die Selektion mit Cefotaxim entstanden nach den ersten drei Transformationsschritten die Stämme R6 C<sub>T3</sub>, R6 CC<sub>T1</sub> sowie R6 CCC<sub>T2</sub> und R6 CCC<sub>T5</sub>. Hierbei wurden zunächst PBP2x und PBP2a verändert. Im dritten Transformationsschritt konnten zwei Stämme mit einem niedrig-affinen PBP1a erhalten werden, wobei in R6 CCC<sub>T5</sub> zusätzlich PBP1b verändert vorliegt. PBP1b wurde trotz der nicht-funktionalen Transpeptidase-Domäne ausgetauscht, scheint aber zu keiner eindeutigen Resistenzhöhung zu führen. Bisher ist ungeklärt, ob PBP1b<sub>B6</sub> einen Vorteil im Zusammenhang mit den anderen veränderten PBP vermittelt (Prutscher, 2008). In einem vierten Transformationsschritt mit Oxacillin bzw. Benzylpenicillin (Penicillin) entstanden die Transformanten R6 CCCO und R6 CCCB, die anhand ihres PBP-Profiles niedrig-affine Varianten aller fünf hochmolekularen PBP zeigen

(s. Abbildung 2.4 B und Hakenbeck *et al.*, 1998). Zudem sind beide Stämme hochresistent gegen die vier getesteten Antibiotika. Dabei konnte unter anderem gegen Penicillin eine bedeutend höhere Resistenz von CCCB festgestellt werden (Hakenbeck *et al.*, 1998).

## 2.5 Zielsetzung

Die Resistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika wird in *S. pneumoniae* hauptsächlich durch Mosaikstrukturen in den Penicillin-bindenden Proteinen vermittelt, aber auch nicht-PBP-Resistenzdeterminanten tragen zur Entstehung der Resistenz bei. Der horizontale Gentransfer ermöglicht die Spezies-übergreifende Ausbreitung von Resistenzdeterminanten unter anderem zwischen *S. mitis* und *S. pneumoniae*.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Transformanten von *S. pneumoniae* R6, die durch sukzessive Transformation mit chromosomaler DNA von *S. mitis* B6 und Selektion mit  $\beta$ -Lactamantibiotika erhalten worden waren (Hakenbeck *et al.*, 1998).

Dabei sollten drei Aspekte detailliert analysiert werden. Zunächst sollte der Beitrag von *S. mitis* B6 PBP2a zur  $\beta$ -Lactamresistenz in Gegenwart von PBP2<sub>XB6</sub> untersucht werden. Weiterhin sollte die Ursache für den Resistenzunterschied zwischen den beiden Transformanten CCCO und CCCB identifiziert werden. Beide Transformanten weisen das gleiche Profil nieder-affiner PBP auf, unterscheiden sich allerdings deutlich in ihrer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamen. Hierbei wurde ein genomischer Vergleich mittels DNA-Microarray-Analysen zugrunde gelegt (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Auf diese Weise identifizierte Gene sollten auf ihre Funktion als Resistenzdeterminanten in CCCB untersucht werden. Ein weiterer Fokus lag auf der Identifizierung möglicher neuer Resistenzdeterminanten, welche von *S. mitis* B6 aus *S. pneumoniae* R6 übertragen werden könnten. Hierzu sollte der bereits hochresistente Stamm CCCB als Rezipient für eine weitere Transformation mit *S. mitis* B6 DNA und Selektion auf diversen  $\beta$ -Lactamantibiotika verwendet werden. In resistenten Transformanten sollten mithilfe von DNA-Microarray-Analysen veränderte Gene identifiziert werden und deren Einfluss auf die  $\beta$ -Lactamresistenz in An- und Abwesenheit bekannter Resistenzdeterminanten analysiert werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Bakterienstämme

In Tabelle 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme bzw. die Ausgangsstämme der Gattung *Streptococcus* aufgeführt. Für diese Arbeit hergestellte Derivate von *S. pneumoniae* sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Verwendete *E. coli* Stämme sind in Tabelle 3.3 verzeichnet. Die hergestellten Stämme CCCB B2 und CCCB O6 wurden nach den Selektionsantibiotika benannt, wobei B für Benzylpenicillin und O für Oxacillin steht. Diese Stämme wurden mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA transformiert.

**Tabelle 3.1: Verwendete Stämme und Ausgangsstämme der Gattung *Streptococcus***

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>S. pneumoniae</i> R6	R36A-Derivat, Wildtyp, kapselfrei, kompetent, $\beta$ -Lactam <sup>S</sup>	Ottolenghi und Hotchkiss, 1962
<i>S. mitis</i> B6	$\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	König <i>et al.</i> , 1998
<i>S. pneumoniae</i> Hu17	$\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	Reichmann <i>et al.</i> , 1995
<i>S. pneumoniae</i> AmiA9	<i>rpsL</i> (K56T), Sm <sup>R</sup>	Salles <i>et al.</i> , 1992
R6 <i>ciaR::aad9</i>	<i>ciaR::aad9</i> , Spc <sup>R</sup>	Mascher <i>et al.</i> , 2003
R6 C <sub>T3</sub>	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-750, $\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998
R6 CC <sub>T1</sub>	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-750, <i>pbp2a</i> <sub>B6</sub> AS1-633, $\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998
R6 CCCO	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-750, <i>pbp2a</i> <sub>B6</sub> AS1-633, <i>pbp1a</i> <sub>B6</sub> , <i>pbp1b</i> <sub>B6</sub> <sup>1</sup> , <i>pbp2b</i> <sub>B6</sub> AS383-489, $\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998
R6 CCCB	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-750, <i>pbp2a</i> <sub>B6</sub> AS1-633, <i>pbp1a</i> <sub>B6</sub> , <i>pbp1b</i> <sub>B6</sub> <sup>1</sup> , <i>pbp2b</i> <sub>B6</sub> , $\beta$ -Lactam <sup>R</sup>	Hakenbeck <i>et al.</i> , 1998

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
R6murE 2x 2b 1a $\Delta murM$	<i>murE</i> , <i>pbp2x</i> , <i>pbp2a</i> , <i>pbp1a</i> aus <i>S. oralis</i> Uo5, <i>murM::janus</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>	Frohnweiler, 2009
R6murE 2x 2b 1a $\Delta murMN$	<i>murE</i> , <i>pbp2x</i> , <i>pbp2a</i> , <i>pbp1a</i> aus <i>S. oralis</i> Uo5, <i>murMN::janus</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>	Frohnweiler, 2009

S = sensitiv; R = resistent; 1 = PBP1b<sub>B6</sub> beinhaltet eine Punktmutation (C1700T), die zu einem Stoppcodon 567 führt

**Tabelle 3.2: Für diese Arbeit hergestellte Derivate von *S. pneumoniae***

Bezeichnung	Genotyp
R6 Strep <sup>R</sup>	<i>rpsL</i> (K56T), Sm <sup>R</sup>
R6 2x <sub>B6</sub>	<i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-600
R6 2x <sub>B6</sub> 2a <sub>B6</sub>	<i>pbp2x</i> <sub>B6</sub> AS46-176 und 281-600, <i>pbp2a</i> <sub>B6</sub> AS411-633
R6 $\Delta spr0683$	<i>spr0683::aad9</i> , Spc <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr0683 \Delta clpL$	<i>spr0683::aad9</i> , <i>clpL::aphIII</i> , Spc <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
R6 <i>spr1851::janus</i>	<i>spr1851::janus</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr1851$	<i>spr1851</i> -Minigen $\Delta AS13$ -317, Sm <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr1851 \Delta clpL$	<i>spr1851</i> -Minigen $\Delta AS13$ -317, <i>clpL::aphIII</i> , Sm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr0683/1851::janus$	<i>spr0683::aad9</i> , <i>spr1851::janus</i> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr0683/1851$	<i>spr0683::aad9</i> , <i>spr1851</i> -Minigen $\Delta AS13$ -317, Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>
R6 $\Delta spr0683/1851 \Delta clpL$	<i>spr0683::aad9</i> , <i>spr1851</i> -Minigen $\Delta AS13$ -317, <i>clpL::aphIII</i> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCO Strep <sup>R</sup>	CCCO, <i>rpsL</i> (K56T), Sm <sup>R</sup>
CCCO <i>murM::janus</i>	CCCO, <i>murM::janus</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCO <i>murM</i> <sub>CCCB</sub>	CCCO, <i>murM</i> <sub>CCCB</sub> , Sm <sup>R</sup>
CCCO <i>murM pbp2b</i> <sub>CCCB</sub>	CCCO, <i>murM</i> <sub>CCCB</sub> , PBP2b V54I T56S, Sm <sup>R</sup>
CCCO <i>murM</i> <sub>B6</sub>	CCCO, <i>murM</i> <sub>B6</sub> , Sm <sup>R</sup>
CCCO <i>murM</i> <sub>Hu17</sub>	CCCO, <i>murM</i> <sub>Hu17</sub> , Sm <sup>R</sup>
CCCO $\Delta murM$	CCCO, <i>murM</i> -Minigen $\Delta AS13$ -395, Sm <sup>R</sup>
CCCO <i>murMN::janus</i>	CCCO, <i>murMN::janus</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCB B2	CCCB, Transformation mit chromosomaler <i>S. mitis</i> B6 DNA, Genotyp teilweise unbekannt, <i>spr0683</i> $\Delta bp25$ -170 $\Delta AS19$ -79
CCCB O6	CCCB, Transformation mit chromosomaler <i>S. mitis</i> B6 DNA, Genotyp teilweise unbekannt, <i>spr1851::smi_0217</i> bp521-988 <sub>B6</sub> $\Delta AS179$ -328, <i>spr1850::smi_0218</i>
CCCB <i>smi0217/0218</i> #2	CCCB, <i>spr1851::smi_0217</i> bp521-988 <sub>B6</sub> $\Delta AS179$ -328, <i>spr1850::smi_0218</i>
CCCB <i>smi0217/0218</i> #8	CCCB, <i>spr1851::smi_0217</i> bp507-988 <sub>B6</sub> C544T $\Delta AS182$ -328, <i>spr1850::smi_0218</i> bp1-345 <sub>B6</sub>

Bezeichnung	Genotyp
CCCB smi0217	CCCB, spr1851::smi_0217, Sm <sup>R</sup>
CCCB Strep <sup>R</sup>	CCCO, <i>rpsL</i> (K56T), Sm <sup>R</sup>
CCCB Δspr0683	CCCB, spr0683::aad9, Spc <sup>R</sup>
CCCB Δspr0683 Δ <i>clpL</i>	CCCB, spr0683::aad9, <i>clpL</i> ::aphIII, Spc <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCB spr1851::janus	CCCB, spr1851::janus, Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCB Δspr1851	CCCB, spr1851-Minigen ΔAS13-317, Sm <sup>R</sup>
CCCB Δspr1851 Δ <i>clpL</i>	CCCB, spr1851-Minigen ΔAS13-317, <i>clpL</i> ::aphIII, Sm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCB Δspr0683/1851::janus	CCCB, spr0683::aad9, spr1851::janus, Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
CCCB Δspr0683/1851	CCCB, spr0683::aad9, spr1851-Minigen ΔAS13-317, Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>
CCCB Δspr0683/1851 Δ <i>clpL</i>	CCCB, spr0683::aad9, spr1851-Minigen ΔAS13-317, <i>clpL</i> ::aphIII, Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>

S = sensitiv; R = resistent

**Tabelle 3.3: Verwendete *E. coli* Stämme**

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21	F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -), <i>gal</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , Δ( <i>lac</i> )U169, (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

## 3.2 Plasmide

In Tabelle 3.4 sind die Eigenschaften des in *E. coli* replikativen und zur Proteinüberexpression verwendeten Vektors pGEX-6P-1 aufgeführt. Zudem zeigt die Tabelle die hergestellten Plasmide.

**Tabelle 3.4: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Merkmale	Selektionsbedingungen	Referenz
pGEX-6P-1	Klonierungsvektor zur Überexpression von GST-tag Proteinen	Ampicillin 100 µg/ml	GE Healthcare
pGEX-6P-1 spr0683	pGEX-6P-1 Derivat; spr0683	Ampicillin 100 µg/ml	Diese Arbeit
pGEX-6P-1 spr1851	pGEX-6P-1 Derivat; spr1851	Ampicillin 100 µg/ml	Diese Arbeit



### 3.3 Oligonukleotide

Den folgenden Tabellen sind die von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisierten Oligonukleotide, sogenannte Primer, zur Konstruktion von Stämmen und Sequenzierungen zu entnehmen. Vor Gebrauch wurden die Stammlösungen mit der Konzentration von 100 pmol/μl 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 3.5: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung verschiedener *murM* Allele**

Name	Sequenz (5'→3')
fib7	GGTGTATTAGAGTTGCTTGTAAAACC
fib8	GTATAACCAATCTGGTTCTCCACC
J1	CTTCGTGACCGTAAGGTCTTGTGTCAGAGG
J11	CTGTTTAAAACGCAAACACCATCACTTCC
J24	CTATGTTTTTTTCTTAATGTTTTACGGAATTCTAATGTGGGAATGCCAATTTGATAACG
J25	CGTTATCAAATTGGCATTCCCACATTAGAATTCCGTAAAACATTAAGAAAAAACATAG
PM67	AACTAATCTCATCGTTGTTATGCCCAATAC
PM68	ACCTGAATTGTAAAAGGTATCTTCATCCAC
PM237	CTTTCCGCCTCTCCTGCCACAGGAGT
PM253	AATAGAAGGAGAAAATCATGGCAGTAATG
PM254	AGGGGCATAGAACTTATTAACCTCAGTG
PM255	TCGCTAGACTTTTTAATCGAAAATAGTAAAATAG
PM256	GGAACGAGAAGAAACCTGATCAGAATAAG
PM257	ATGCTCGCAGTAAGAGAGCGGTTTTTTGTG
PM264	AACATCCTCTTCCTGGATACCATAAAAAGG
S134	AAGTTTATCTTCTTCAAATTTTCC
S135	GAGAAGTTTGGTGTTCACAGGG

**Tabelle 3.6: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp1a*, *pbp2a* und *pbp2x***

Name	Sequenz (5'→3')
aliA-rev1a	CGCCAATCTTGTCTAAGATGGTACCATTTAC
pbp1a-Seq_for	GGTTACATCTCTGCTGAACAG
pbp1a-Seq_rev	CATCTGGAGCTACATAGCCAG
PM74	GGAAATGGGATTACCTATGCCAATATGATG
PM75	AACTAGAAGCAAATTGTCCGTTTGGGTAACCTACG
PM76	CCGTCATTAGCAATAGCTGTAAAGGCACG
PM79	TTAGTCTCCTAAAGTTAATGTAATTTTTTTAATG
PM80	GCAAACCACCAATCATGGCAAGAATCACTAG
PM109	TGACCAAGCAATTGTTCAAAGAGGCTTCAACAGTTG

Name	Sequenz (5'→3')
PM111	CCAGGCGATGAACGACATAGCAGGTTTG
PM112	TGTGTTGGAATCTCAACGCGTAGAATATTATCCAAC
PM115	TTTATATGCAAACCAAGCTCTTGCAAG
PM118	TTCGTGCCTTTACAGCTATTGCTAATG
PM120	TAAAGTTAGTAAAAATGTCACAATTCAGCAC
PM131	GATATTGTAACAAAAAAGCCCTATTTGGATAGG
PM132	CCAATGTCAATGATTTGCAAAATGCCTTGAAAAC
PM134	TACACAGAGCTTGACCAAAACTACCAAGC
PM135	GGTCATTTTATCAGCTACAGACTTATCAATCAC
PM136	CTTTTTTTAGTGCCATAACGCCTCCATCTTATC
PM197	TCAAGTTGGTCAAACCTGCC
recU-R6-2	GATTTGATTGCTTCTATCATCAAGATAAGG

**Tabelle 3.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp2b***

Name	Sequenz (5'→3')
PM91	GCAGAAAGGAGATTTTTTGCAAATTCATTG
PM92	CCTACCAGATGAATCTACTGGATTTGTTCCC
PM93	GCAATAGTTGCTACATACTGAGCCAACCTGC
PM94	GCAATATGAAGAGACCTTACAAGGAAAACG
PM95	GGTCAGTTTGATATTGTTTCCCTTACTACC
PM96	GTGGGGAAATTTATGATGCTAGTGGAAAAC
PM97	GATGCTCACATAAGTCAGTAACTTTTTAGC
PM98	CTGAGGACTCGTTTGGTCAGTGGACTGTGC
PM114	ACCTCTGAAACCTCGCTATCCATAAGACG

**Tabelle 3.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaH***

Name	Sequenz (5'→3')
CiaH_for	TCGGTTGTCGAAGTCTATGTTTCAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC

**Tabelle 3.9: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *spr0683***

Name	Sequenz (5'→3')
J26	CAGGCGATATGAAGGGTTTG
J27	GTTCTTAAATAAAGTTCAGG
J28	CACCAGAATTTTTGGAATATC

**Tabelle 3.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von spr1850, spr1851**

Name	Sequenz (5'→3')
J29	CTTCTTTGCGGAAATCATTCCG
J30	GCAAATTGCTGTTGGTGACC
J31	GCCAAGAAAAAGGCTCAGAAAACG
J32	GTTGCCATTCTGGATGGCTTGC
J33	CCAAGAATTACACAGCGGACTG

**Tabelle 3.11: Oligonukleotide zur Klonierung verschiedener *murM* Allele sowie zur Inaktivierung von *murM* und *murN***

Name	Sequenz (5'→3')
amiA9_fwd1	GGCTCTAGGTCTTCAAAGATATCGACTTTGG
amiA9_rev1	AAACAGTGTCTGATTTCTTGACGGCTGTTAGCG
J2	GCTCATATAGTCCGAAAAATTTAAGCTTGC
J3	GGAATGCCAATTTGATAACGGTACATTTCTACTCTCTTTCCTCCAGTATTTTATT AC
J4	GGAGGAAAGAGAGTAGGAAATGTACCGTTATCAAATTGGCATTCCCACATTAG
J5	GTGTTGTTAGTGCCATATACTTACTTTCTATGTTTTTTTCTTAAGGTTTTACG
J6	GAAAAAACATAGAAAGTAAGTATATGGCACTAACAACTCACGAAAGAAG
J7	ATACTGGAGGAAAGAGAGTAGGAAATGTATCGTTATCAGCTTGGGATACC
J8	GTGTTGTTAGTGCCATATACTTACTTTCTATGTTTTTTTCTTAATGTTTTACGG
J9	GGTATCCCAAGCTGATAACGATACATTTCTACTCTCTTTCCTCCAGTATTTTATT AC
J10	GTA AACATTAAGAAAAAACATAGAAAGTAAGTATATGGCACTAACAACTCAC G
J24	CTATGTTTTTTTCTTAATGTTTTACGGAATTCTAATGTGGGAATGCCAATTTGATAA CG
J25	CGTTATCAAATTGGCATTCCCACATTAGAATTCGTA AACATTAAGAAAAAACAT TAG
PM263	ACTTTTGCACGGGATGTCTGGAAATC

**Tabelle 3.12: Oligonukleotide zur Inaktivierung von spr0683**

Name	Schnittstelle	Sequenz (5'→3')
J34		CAACACTTCATGGTTCACACC
J35	<i>Sall</i>	TGCGG <u>T</u> CGA <u>C</u> TGTCAACCTACTTTAACTTATTTTG
J36	<i>NotI</i>	AAGGAAAAAAGCGG <u>C</u> CGCTAATCAGAGAAGGGCGGGACG
J37		CGGACTCCTACCTGTGTTCCG
PM149	<i>Sall</i>	ACGCG <u>T</u> CGA <u>C</u> ATCGATTTTCGTTTCGTGAATACATG
PM167	<i>NotI</i>	TTTTCTTTT <u>G</u> CGG <u>C</u> CGCCAATTAGAATGAATATTTCCC

Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

**Tabelle 3.13: Oligonukleotide zum Austausch von spr1851 gegen smi\_0217**

Name	Sequenz (5'→3')
J50	GTTGAACCTGTAAATACTACCATTACCAGATTCCTCCTTATTTATTTTCGTTTTCTGAGC
J51	AAATAAATAAGGAGGAATCTGGTAATGGTAGTATTTACAGGTTCAACTGTTGAAGAAGC
J52	CTAGCAAAAATCAGGATAAACCTGATTTTACTTATTCTGTATCTACAACGACATAGCG
J53	CGTTGTAGATACAGAATAAGTAAAATCAGGTTTATCCTGATTTTTTGCTAGTTAGAGG

**Tabelle 3.14: Oligonukleotide zur Inaktivierung von spr1851**

Name	Sequenz (5'→3')
amiA9_fwd1	GGCTCTAGGTCTTCAAAGATATCGACTTTGG
amiA9_rev1	AAACAGTGTGCGATTTCTTGACGGCTGTTAGCG
janus_f	CCTATTCCAGAGGAAATGGATCGGATCCG
janus_r	GGGCCCTTTTCTTATGCTTTTTGGACG
J29	CTTCTTTGCGGAAATCATTCCG
J33	CCAAGAATTACACAGCGGACTG
J48	GGATCCGATCCATTTCTCTGGAATAGGTACCAGATTCCTCCTTATTTATTTTCGTT TTC
J49	CGTCCAAAAGCATAAGGAAAGGGCCCGTAAAATCAGGTTTATCCTGATTTTTTG CTAG
J58	GTATTTACAGGTTCAACTGTTGAAGAAGCAGAGCCAAATCGCTATGTTGTTGTAG ATAC
J59	GTATCTACAACAACATAGCGATTTGGCTCTGCTTCTTCAACAGTTGAACCTGTAAA TAC

**Tabelle 3.15: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Inaktivierung von *clpL***

Name	Sequenz (5'→3')
cheshire-aphIII-rev	CGGCTAAGCGGCTGTCTAAG
J60	GGAGTTATTGCCTATGTGCAAGG
J61	GGCAACCTCAAAGGAAGCGAAGC
J62	CAAAAAGAGGTAAAGAATCGCGTTCGACGCCTATTCCAGAGGAAATGGATC GGATCCG
J63	CTCCTTCTTTTTATCCTCAAATCTGTCCGCGCATGCATCAGAGTATGG ACAGTTGC
J64	CCTCTGGAATAGGCGTCGACGCGATTCTTTACCTCTTTTTGTTATTTATTAT TAC
J65	GCAACTGTCCATACTCTGATGCATGCGCGGACAGAATTTTGAGGATAAAA AAGAAGGAG
J66	CATCTCGGTAGCCGCAATCCACGCC
J67	GATGTAAGAATGGCACCCTGATG
J68	CCATTTGGTTGCCGCACAGGC

**Tabelle 3.16: Oligonukleotide zur Klonierung von spr0683 und spr1851 für die Proteinüberexpression**

Name	Schnittstelle	Sequenz (5'→3')
PM250		GGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACC
PM251		CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
J54	<i>Bam</i> HI	CGCGGATCCATGGATACGATTGAAAATCTC
J55	<i>Sal</i> I	ACGCGTCCGACTTATTTTTTCGTCAATAACGATTC
J56	<i>Bam</i> HI	CGCGGATCCGTGGTAGTATTTACAGGTTC
J57	<i>Sal</i> I	ACGCGTCCGACTTATTCTGTATCTACAACAAC

Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

## 3.4 Nährmedien

### 3.4.1 C-Medium (CpH8)

Zur Anzucht von *S. pneumoniae* wurde ein Komplexmedium, das C-Medium, verwendet (Lacks und Hotchkiss, 1960). Die Zusammensetzung des Mediums ist Tabelle 3.17 zu entnehmen. Die verschiedenen Komponenten sind in Tabelle 3.18 aufgelistet. Sie wurden einzeln hergestellt, vor Gebrauch steril zusammenpipettiert und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 3.17: Zusammensetzung des C-Mediums**

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

**Tabelle 3.18: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums**

Komponente	Menge
<b>Pre C</b>	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
<b>Supplement</b>	
3 in 1 Salts	60 ml
20 % Glucose	120 ml
50 % Saccharose	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
Komponenten einzeln autoklavieren, steril zusammenpipettieren	
<b>Adams III</b>	
Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	1,6 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren, dunkel lagern	
<b>Phosphatpuffer (pH 8,0)</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	53 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	947 ml
autoklavieren	
<b>3 in 1 Salts</b>	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 g
CaCl <sub>2</sub> , wasserfrei	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O (0,1 M)	0,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
autoklavieren	

Komponente	Menge
<b>Adams I</b>	
Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl (B6)	175 mg
Ca-Panhotenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren, dunkel lagern	
<b>Adams II</b>	
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	200 mg
HCl konz.	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
sterilfiltrieren, dunkel lagern	

### 3.4.2 D-Blutagar

Zur Kultivierung von Streptokokken auf Festmedium wurde D-Agar verwendet (Tabelle 3.19). Der D-Agar wurde im Anschluss an das Autoklavieren auf 50°C abgekühlt und mit 3 % (v/v) Schafsblut versetzt (Oxoid). Gegebenenfalls wurden Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben (Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.19: Zusammensetzung des D-Agars**

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 <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### 3.4.3 LB-Medium und -Agar

Zur Anzucht von *E. coli* wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Das Fertigmedium der Firma Roth wurde nach Herstellerangaben mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt und autoklaviert. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar und gegebenenfalls Antibiotika (Tabelle 3.20) zugegeben.

## 3.5 Antibiotika

Zur Selektion wurden Stammlösungen der in Tabelle 3.20 aufgelisteten Antibiotika mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hergestellt und bei Bedarf in entsprechender Konzentration den Medien zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 3.20: Verwendete Antibiotika**

Antibiotika	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	100
Cefotaxim	10	variabel
Kanamycin	50	200
Oxacillin	10	variabel
Penicillin G	10	variabel
Piperacillin	10	variabel
Spectinomycin	100	80
Streptomycin	200	200

## 3.6 Anzucht und Wachstum

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte schüttelnd bei 37°C in flüssigem LB-Medium, wobei für Wachstumsmessungen die optischen Dichte (OD) bei 600 nm mittels eines Photometers (Ultrospec 500, Biochrom Ltd) bestimmt wurde. Angeimpft wurde entweder aus einer Glycerinkultur (s. Abschnitt 3.7) oder von LB-Agarplatten. Streptokokken wurden in Flüssigkultur bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Hierzu wurden 6 ml C-Medium entweder von einer D-Blutagarplatte oder mit 100-200 µl einer Glycerinkultur beimpft. Im Falle einer Vorkultur wurden die Zellen bis zur



exponentiellen Phase angezogen, anschließend 1:20 in frisches C-Medium überimpft und weiter inkubiert. Das Wachstum der Streptokokken wurde anhand der Lichtstreuung der Zellen (Nephelo, N) mithilfe eines Nephelometers (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems Ltd) gemessen. Hierbei diente nicht-beimpftes Medium als Referenz. Das Wachstum wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, wobei die Wachstumsrate  $\mu$  und die Generationszeit  $g$  anhand der exponentiellen Wachstumsphase mittels folgender Formeln bestimmt wurden:

$$\mu [\text{min}^{-1}] = \frac{(\ln N - \ln N_0)}{(t - t_0)}$$

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

$N$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t$

$N_0$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$

$(t - t_0)$  = Zeitdifferenz [min]

### 3.7 Stammkonservierung

Zur dauerhaften Konservierung von *Streptococcus*- und *E. coli*-Stämmen wurden Kulturen bis zu einer Nephelo von ca. 70 inkubiert. Glycerin wurde mit einer Endkonzentration von 20 % zugegeben und die Glycerinkultur anschließend in einem Cryoröhrchen (Nunc) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.8 Mikroskopie

Zur Erfassung möglicher morphologischer Veränderungen der in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht. Hierzu wurden 5  $\mu\text{l}$  der Kulturen während des exponentiellen Wachstums entnommen und mithilfe eines 100x-Objektivs (Plan Apo, Nikon Eclipse E600) untersucht und dokumentiert (Kamera: CCD-1300B, VDS Vosskühler).

## 3.9 Transformation von *Escherichia coli*

### 3.9.1 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

*E. coli* ist nicht natürlich kompetent. Zur Erzeugung der Kompetenz wurde daher die Methode von Hanahan (1983) verwendet.

Hierzu wurden 200 ml LB-Medium beimpft und schüttelnd (Innova™ 2300 Platform Shaker, New Brunswick Scientific Co.) bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde in 50 ml Greinerröhrchen überführt, auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 8.500 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 16 ml kaltem TFB1-Puffer (Tabelle 3.21) resuspendiert und 90 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt und erneut das Entfernen des Überstands. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 1,6 ml kaltem TFB2-Puffer (Tabelle 3.21) wurden die kompetenten Zellen in 100 µl Portionen in ERGs (Eppendorf-Reaktionsgefäßen) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Tabelle 3.21: Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

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

### **3.9.2 Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 5-10 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Dieser Transformationsansatz wurde zunächst 30 min auf Eis gehalten. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C im Wasserbad bevor die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der gesamte Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde der Ansatz in ein ERG überführt und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Hermle Z233 M-2), das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

### **3.10 Transformation von *Streptococcus pneumoniae***

#### **3.10.1 Herstellung kompetenter Zellen von *S. pneumoniae***

Die natürliche Kompetenz von *S. pneumoniae* verleiht dem Bakterium die Möglichkeit DNA aufzunehmen, wobei die maximale Kompetenz im mittleren exponentiellen Bereich liegt. Zur Herstellung kompetenter *S. pneumoniae*-Zellen wurden 6 ml vorgewärmtes C-Medium mit einer Vorkultur im Verhältnis 1:20 beimpft und unter Zugabe von BSA (New England Biolabs) in einer Endkonzentration von 0,072 % bei 37°C inkubiert. Wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, wurden bei Erreichen einer Nephelo von 30 Glycerinkulturen angefertigt.

#### **3.10.2 Transformation und Bestimmung der Transformationseffizienz von *S. pneumoniae***

Für die Transformation wurden kompetente *S. pneumoniae*-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut bevor 20 µl der Zellen mit 180 µl C-Medium und ca. 150 ng der zu transformierenden DNA mit Zusatz von BSA (0,064 % Endkonzentration) vermischt wurden. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit TE (s. Tabelle 3.23) statt DNA.

Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 30°C inkubiert, gefolgt von einer zweistündigen phänotypischen Expression bei 37°C. Je 100 µl des unverdünnten Ansatzes sowie entsprechender Verdünnungen, welche mit 0,9 % NaCl hergestellt wurden, wurden auf D-Blutagarplatten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden zusätzlich 100 µl der entsprechenden Verdünnungen auf D-Blutagarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Nach einer Inkubation für 24 bis 48 h bei 37°C wurden einzelne Kolonien auf Blutagarplatten überstrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von diesem Ausstrich wurde eine Flüssigkultur angesetzt, welche zur Herstellung von Glycerinkulturen diente (s. Abschnitt 3.7).

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde sowohl die Zahl der Kolonien mit als auch der Kolonien ohne selektives Antibiotikum ermittelt. Der Prozentsatz der Transformanten auf den Antibiotikaplatten ergibt die Transformationseffizienz.

### **3.11 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wird die Konzentration eines Antibiotikums bezeichnet, bei der kein Wachstum der Bakterien mehr möglich ist. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der MHK indem ein definiertes Volumen der Bakterienkulturen auf D-Blutagarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Antibiotikums pipettiert wurde (Tabelle 3.22). Der hier verwendete Agardilutionstest geht auf die Methode von Andrews (2001) zurück.

Dafür wurden die Bakterien bei 37°C in C-Medium bis zu einer Nephelo von 30 angezogen und anschließend 1:1.000 in eiskaltem 0,9 % NaCl verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 30 µl auf die einzelnen Antibiotikaplatten aufgetropft und bei 37°C inkubiert. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte nach 48 h (Kamera: Sony DFW-X700).

**Tabelle 3.22: D-Blutagarplatten für die MHK-Bestimmung**

Komponente	Menge
D-Medium	47,5 ml
Agar	0,75 g
Schafsblut	1,5 ml
Antibiotikum	je nach Konzentration
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 ml

### 3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Herstellerangaben mit dem QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen) isoliert.

### 3.13 Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptokokken

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* und *S. mitis* beruht auf einer Methode von Marmur (1961).

Zunächst wurden 6 ml einer *S. pneumoniae*-Kultur bis zu einer Nephelo von 80-90 angezogen. Das nach zehnmütiger Zentrifugation bei 8.500 rpm und 4°C erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml eiskalter Saline (0,9 % NaCl) resuspendiert, in ein ERG überführt und erneut für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µl TE-Puffer (Tabelle 3.23) gelöst, zudem wurde der Ansatz mit 10 µl RNase A Lösung (10 mg/ml) versetzt und 200 µl SDS-Lösung (2 %) zugegeben. Das ERG wurde bis zur vollständigen Zelllyse bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 37°C. Die Proteine wurden dann mittels einer Phenol-Extraktion von der DNA getrennt. Hierzu wurde das Lysat mit 500 µl Phenol aus einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) versetzt und für 30 min auf einem Eppendorf Schüttler geschüttelt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die DNA-haltige Oberphase in ein neues ERG überführt, ein zweites Mal 500 µl Phenol zugegeben und geschüttelt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die Oberphase mit 500 µl

Isopropanol (100 %, -20°C) zur Fällung der DNA versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, das Sediment zweimal mit 200 µl Ethanol (100 %, -20°C) gewaschen und in der SpeedVac getrocknet (Univapo 100 H). Die DNA wurde in 25 bis 50 µl TE-Puffer für 1 h bei 37°C gelöst und bei -20°C gelagert. Alle Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA sind in Tabelle 3.23 aufgelistet. Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies).

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. mitis* wurde den resuspendierten Zellen zusätzlich 90 µl Lysozym (25 mg/ml) und 5 µl Mutanolysin (0,5 mg/ml) zugegeben.

**Tabelle 3.23: Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken**

Komponente	Menge/Konzentration
<b>TE</b>	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren	
<b>RNase A Lösung</b>	
RNase A (Roth)	10 mg/ml
Tris	10 mM
NaCl	15 mM
pH 7,5 mit HCl einstellen, 15 min bei 100°C kochen, bei -20°C lagern	
<b>Proteinase K</b> (Applichem)	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>Lysozym</b> (Applichem)	25 mg/ml
<b>Mutanolysin</b> (Sigma Aldrich)	0,5 mg/ml

### 3.14 Isolierung von RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* wurde die sogenannte Hot Phenol-Methode verwendet (Maes und Messens, 1992). Zur Vermeidung von Verunreinigungen mit RNase wurden bei den folgenden Arbeitsschritten Handschuhe getragen sowie Spitzen mit Filtern für die automatischen Pipetten verwendet (Greiner Bio-One). Zudem wurden die Oberflächen von Apparaturen mit RNaseZap® (Ambion) gereinigt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3.24 aufgelistet.

Zunächst wurden 145 ml vorgewärmtes C-Medium 1:30 mit einer Vorkultur beimpft und in 250 ml Reaktionsflaschen (Schott) im Wasserbad bei 37°C bis zu einer Nephelo von 40-50 inkubiert. Für die Messung wurden 6 ml in ein Reagenzglas umgefüllt. Je 100 ml der Zellkultur wurden anschließend auf zwei Greinerröhrchen verteilt und bei 8.000 rpm und 19°C für 6 min abzen trifugiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zum Zellaufschluß wurde zu beiden Pellets 4 ml, auf 60°C erwärmtes NAE-gesättigtes Phenol-Chloroform gegeben und gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Nach dem Vereinigen beider Pellets folgte eine fünfminütige Inkubation bei 60°C im Wasserbad bevor 5 ml NAES-Puffer zugesetzt wurden. Im Anschluss an eine weitere fünfminütige Inkubation bei 60°C wurde erneut gevortext und die Zellen für 5 min auf Eis gehalten. Zur Phasentrennung schloss sich eine achtminütige Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4°C an. Die wässrige Oberphase wurde in ein Phase Lock Gel-Röhrchen (MaXtract High Density, Qiagen) überführt, welches zuvor mit 4 ml NAE-gesättigtem Phenol-Chloroform gefüllt wurde. Nach mehrmaligem Invertieren wurde der Ansatz erneut für 8 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das in den Phase Lock Gel-Röhrchen enthaltene Gel ermöglicht eine saubere Trennung von organischer und wässriger Phase, sodass die wässrige Oberphase in ein neues Phase Lock Gel-Röhrchen gegossen werden konnte. Nach wiederholter Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Oberphase in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und durch Zugabe von 400 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,0) sowie 4 ml Isopropanol nach mehrmaligem Invertieren die Gesamt-Nukleinsäure über Nacht bei -20°C gefällt.

Es folgte eine Zentrifugation für 40 min bei 8.000 rpm (4°C). Das erhaltene Pellet wurde mit 3 ml EtOH (70 %) gewaschen und in einem Exsikkator getrocknet bevor es in 450 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst wurde.

Zur Entfernung der chromosomalen DNA wurde der Ansatz mit DNaseI (New England Biolabs) behandelt. Der gesamte Ansatz wurde mit 10 µl (2 U/µl) DNaseI (RNase-frei) und 50 µl DNaseI-Puffer (10x) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy-Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA wurde zweimal mit je 150 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4.000 rpm und Raumtemperatur. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop bestimmt und anhand eines TBE-Agarosegels (s. Abschnitt 3.16) überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

**Tabelle 3.24: Lösungen zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae***

Komponente	Konzentration
<b>NAE-Puffer</b>	
Natriumacetat, pH 5,0	50 mM
EDTA	10 mM
<b>NAES-Puffer</b>	
NAE-Puffer	
SDS	1 %
<b>NAE-gesättigtes Phenol-Chloroform (6:1)</b>	
Phenol-Chloroform (6:1)	
NAE-Puffer	10 %

### 3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction = PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation von DNA mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Mullis *et al.*, 1986).

Zunächst kommt es bei einer Temperatur zwischen 96 und 98°C zum Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA (Denaturierung). Im zweiten Schritt können spezifische Primer, welche die zu amplifizierende DNA flankieren (up- und downstream Primer),



an die komplementäre Sequenz des Einzelstranges binden (Annealing). Diese temperaturabhängige Bindung wird durch die Länge und den GC-Gehalt der Primer bestimmt. Im PCR-Programm wurde die Temperatur des Annealings meist 5°C unter der Schmelztemperatur angesetzt. Die Elongation erfolgte bei einer Temperatur von 72°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase. Diese synthetisiert die komplementären DNA-Stränge des Templates ausgehend vom 3'-Ende der Primer. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Dieser dreigliedrige Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, wurde 30 bis 34 Mal wiederholt. Da die neu synthetisierte DNA ebenfalls als Template dienen kann, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation. Es wurden verschiedene Thermocycler der Firma Biometra verwendet.

In dieser Arbeit wurden zwei DNA-Polymerasen eingesetzt. Die Taq-Polymerase GoldStar® (Eurogentec), welche aus *Thermus aquaticus* stammt, wurde für PCRs zur Sequenzierung und Überprüfung von Transformanten verwendet. Die iProof™ High Fidelity Polymerase (Bio-Rad) diente der Amplifikation von Fragmenten zur späteren Klonierung und Transformation. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, eine sogenannte Korrekturlesefunktion, welche zu einer geringeren Fehlerrate führt. Die Reaktionsansätze und PCR-Programme für beide DNA-Polymerasen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

**Tabelle 3.25: Reaktionsansatz der GoldStar® DNA-Polymerase**

Komponente	Menge (µl)
Puffer (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
dNTP-Mix (10 mM)	2
Primer forward (10 pmol/µl)	1
Primer reverse (10 pmol/µl)	1
GoldStar®-Polymerase (5 U/µl)	0,5
Template DNA (100 ng/µl)	1
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50

**Tabelle 3.26: Reaktionsansatz der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase**

Komponente	Menge (µl)
HF-Puffer (5x)	10
dNTP-Mix (10 mM)	1
Primer forward (10 pmol/µl)	2,5
Primer reverse (10 pmol/µl)	2,5
iProof™-Polymerase (2 U/µl)	0,5
Template DNA (100 ng/µl)	0,5-1
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50

**Tabelle 3.27: PCR-Programm der GoldStar® DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Denaturierung	96°C	120 s	
2 Denaturierung	96°C	30 s	
3 Annealing	T <sub>m</sub> -5°C	30 s	34-malige Wiederholung
4 Elongation	72°C	1 min/kb	
5 Elongation	72°C	240 s	
6 Pause	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

**Tabelle 3.28: PCR-Programm der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Denaturierung	98°C	120 s	
2 Denaturierung	98°C	10 s	
3 Annealing	T <sub>m</sub> -5°C	30 s	34-malige Wiederholung
4 Elongation	72°C	30 s/kb	
5 Elongation	72°C	240 s	
6 Pause	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

Zur Überprüfung von Transformanten wurde anstatt chromosomaler DNA eine Zellkultur als Template für die PCR eingesetzt. Hierzu wurden 100 µl der wachsenden Kultur für 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert. Hiervon wurden 2 bis 4 µl als Template eingesetzt und der erste Denaturierungsschritt auf 5 min verlängert.

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das Jetquick PCR-Purification Kit (Genomed) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die DNA-

Konzentration mithilfe des NanoDrops bestimmt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei -20°C.

Sequenzierungen wurden mithilfe der Programme Phred/Phrap und Consed ausgewertet. Für Sequenzvergleiche wurde der Internetdienst Multalign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) verwendet.

### **3.15.1 Überlappende PCR**

Die sogenannte überlappende PCR dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten, die mithilfe von homologen Überhängen zusammengefügt werden um ein PCR-Produkt über die volle Länge zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde die überlappende PCR für das Zusammenfügen von Resistenzkassetten mit flankierenden Bereichen und die Konstruktion von Minigenen verwendet.

Zunächst wurden zwei bis drei Einzelfragmente, welche zusammengefügt werden sollten, mittels der in Abschnitt 3.15 beschriebenen PCR amplifiziert. Anschließend wurden diese PCR-Produkte als Templates für die überlappende PCR eingesetzt (Tabelle 3.29). Der erste Schritt diente der Anlagerung homologer, überlappender Enden der Einzelfragmente, welche so als Template für die DNA-Polymerase fungierten. Erst im Anschluss an diesen Zyklus führte die Zugabe von Primern zu einer Amplifikation des auf diese Weise generierten Fragments über die volle Länge (Tabelle 3.30).

**Tabelle 3.29: Reaktionsansatz einer überlappenden PCR mit der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase**

Komponente	Menge (µl)
HF-Puffer (5x)	10
dNTP-Mix (10 mM)	1
iProof™-Polymerase (2 U/µl)	0,5
Template DNA 1	0,5
Template DNA 2	0,5
Template DNA 3	0,5
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50
<b>Zugabe im Anschluss an den ersten Zyklus</b>	
Primer forward (10 pmol/µl)	2,5
Primer reverse (10 pmol/µl)	2,5

**Tabelle 3.30: PCR-Programm einer überlappenden PCR mit der iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit	Besonderheiten/Zyklen
1 Denaturierung	95°C	300 s	
2 Annealing	60°C	60 s	
3 Elongation	72°C	120 s	
4 Pause	30°C	Pause	Primerzugabe
5 Denaturierung	98°C	300 s	
6 Denaturierung	98°C	10 s	
7 Annealing	T <sub>m</sub> -5°C	30 s	30-malige Wiederholung
8 Elongation	72°C	30 s/kb	
9 Elongation	72°C	300 s	
10 Pause	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

Die Aufreinigung einer überlappenden PCR erfolgte, wie in Abschnitt 3.16.1 beschrieben, aus einem Agarosegel.

### 3.16 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese dient der größenspezifischen Auftrennung von Nukleinsäuren. Hierbei wandert die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladene Nukleinsäure im elektrischen Feld durch das Agarosegel von der

Kathode zur Anode. Die Poren der Gelmatrix ermöglichen dabei eine Größenauf-trennung, indem kleinere Fragmente leichter durch die Poren gelangen als größere. Zum Anfertigen von Agarosegelen wurde die Agarose (LE Agarose, Biozym) entweder in TAE- (zur Auftrennung von DNA) oder TBE-Puffer (zur Auftrennung von RNA) in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine Gelapparatur gegossen (Tabelle 3.31). Mithilfe eines Kamms wurden die Probetaschen geformt. In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für ca. 1 h. Zur Auftrennung von DNA wurde diese mit dem 6x Ladepuffer von Fermentas versetzt. Zur RNA wurde 2x RNA-Ladepuffer gegeben (Fermentas). Die Bestimmung der Bandengröße erfolgte anhand des Generuler 1 kb-Markers (Fermentas).

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele für ca. 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert. Die Nukleinsäurebanden wurden auf dem UV-Transilluminator (Oncor M-20, Appligene) detektiert und dokumentiert (Video Copy Processor, Mitsubishi).

**Tabelle 3.31:    Verwendete Puffer zur Herstellung  
                  von Agarosegelen**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
<b>TBE-Puffer (10x)</b>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### 3.16.1 DNA-Elution aus Agarosegelen

PCR-Fragmente, die transformiert werden sollten, wurden grundsätzlich durch die Elution aus einem Agarosegel von Rückständen chromosomaler DNA gereinigt. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden größere Taschen angefertigt, die einen kompletten PCR-Reaktionsansatz fassen. Die Ethidiumbromid-Färbung erfolgte lediglich für eine 2 µl Probe in einer extra Spur des Gels. Anhand dessen wurde die restliche Probe „blind“ aus dem Gel extrahiert. Hierdurch wurde die Schädigung der zu transformierenden DNA durch UV-Licht verhindert. Für die darauf folgende Extraktion und Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück wurde das Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel verwendet (Durchführung gemäß den Herstellerangaben). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mithilfe des NanoDrops.

### 3.17 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Basensequenzen und können an diesen Stellen DNA gezielt schneiden. Diese definierten Enden der DNA-Moleküle können anschließend ligiert werden (s. Abschnitt 3.18). Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei überhängende Enden (sticky end) oder gerade Enden (blunt end). Zum Verdau von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Enzyme der Firmen New England Biolabs und Roche sowie die dazugehörigen Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte in der Regel für 1-2 h oder über Nacht bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Gelextraktion mit dem Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel, wie in Abschnitt 3.16.1 beschrieben.

### 3.18 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase von Invitrogen (1 U/µl) mit dem zugehörigen Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Bei Ligationen eines linearisierten Vektors mit einem Insert wurde ein molares Verhältnis von 1:3 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

### 3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen, wobei das Gel als Molekularsieb dient und die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes unterschiedlich schnell passieren lässt. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an, hebt nichtkovalente Wechselwirkungen auf und überdeckt die Eigenladung des Proteins. Dadurch ist eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht möglich.

Die Gelmatrix besteht aus monomerem Acrylamid, welches durch Zugabe des Radikalbildners APS (Ammoniumpersulfat) zu langen Ketten polymerisiert, die durch Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die sich aus einem Sammelgel (5 %) und einem darunter befindlichen Trenngel zusammensetzen (Tabelle 3.32 und Tabelle 3.33). Das Sammelgel dient einer verbesserten Schärfe der Banden.

Für die SDS-PAGE wurden entweder kleine Gele mit Mini-Protean 3 Gelapparaturen (Bio-Rad) oder große Gele verwendet. Vor dem Gießen wurden die Platten, Kämmen und Spacer zunächst mit Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Nach dem Einfüllen des Trenngels wurde dieses mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  überschichtet um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Im Anschluss an das Aushärten des Trenngels wurde das Wasser verworfen, das Sammelgel eingegossen und ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen eingesteckt. Die Zelllysate (s. Abschnitt 3.20) wurden mit 2x Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 3.34) versetzt und für 2 min bei 95°C denaturiert. Leere Taschen des Gels wurden ebenfalls mit 2x Lämmli-Probenpuffer gefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde für Bocillin- bzw. Coomassie-Gele der peqGoldII Marker (peqLab) oder für Gele, mit denen ein Western Blot durchgeführt wurde, der peqGoldIV Marker (peqLab) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Lämmli-Laufpuffer für kleine Gele bei 100 V, für große Gele bei 200 V.

Zur Färbung der Proteine mit Coomassie wurden die Gele für 1-2 h in Coomassie-Färbelösung gelegt und geschwenkt (Tabelle 3.34). Die Gele wurden 1-2 h mit Entfärber 1 sowie 1 h mit Entfärber 2 zur Entfärbung des Hintergrunds behandelt und anschließend dokumentiert.

**Tabelle 3.32: Zusammensetzung eines 5 %-igen Sammelgels für die SDS-PAGE**

Komponente	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2,85 ml
30 % AA:0,8 % BAA (Gel 30, Carl Roth)	0,85 ml
Tris (0,5 M; pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10 %)	50 µl
APS (10 %)	25 µl
TEMED (Sigma-Aldrich)	2,5 µl

Die Zusammensetzung bezieht sich auf ein kleines Gel.

**Tabelle 3.33: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE**

Komponente	Menge		
	Trenngel 7,5 % (Spezial)	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	7 ml	6 ml	3,54 ml
30 % AA:0,8 % BAA (Gel 30, Carl Roth)	-	4,95 ml	7,5 ml
30 % AA (Gel A, Carl Roth)	5 ml	-	-
2 % BAA (Gel B, Carl Roth)	2,75 ml	-	-
Tris (1,5 M; pH 8,8)	5 ml	3,75 ml	3,75 ml
SDS (10 %)	200 µl	150 µl	150 µl
APS (10 %)	50 µl	75 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Die Zusammensetzung bezieht sich auf ein großes Gel.

**Tabelle 3.34: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

Komponente	Menge
<b>2x Lämmli-Probenpuffer</b>	
Tris (0,5 M; pH 6,8)	1,875 ml
Glycerin (50 %)	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
2-Mercaptoethanol	750 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1,875 ml
<b>5x Lämmli-Laufpuffer</b>	
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 2 l
pH 8,3 einstellen	



Komponente	Menge
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
über Nacht in einem geschlossenen Gefäß rühren, filtrieren	
<b>Entfärber 1</b>	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
<b>Entfärber 2</b>	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### 3.20 Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die entsprechenden Zellkulturen bis zu einer Nephelo von 60 bis 90 angezogen und anschließend in 15 ml Greinerröhrchen oder ERGs abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in einer definierten Menge Natriumphosphat-Puffer (20 mM) mit Triton X 100 (0,2 %) resuspendiert. Die Menge des Puffers wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{ml}} \times \frac{\text{Nephelo}}{20} \times 5 \mu\text{l}$$

Anschließend wurden die resuspendierten Zellen für 30 min bei 37°C lysiert. Die Zelllysate wurden entweder direkt für die SDS-PAGE verwendet (s. Abschnitt 3.19) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.21 Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen mit Bocillin

Die Penicillin-bindenden Proteine wurden mit Bocillin™ FL (Invitrogen), einem Penicillin V-Derivat (Zhao *et al.*, 1999), markiert.

Zur Markierung wurden 5 µl Zelllysate mit Bocillin in einer Endkonzentration von 0,2-2 µM versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Proben, wie in Abschnitt 3.19 beschrieben, aufgekocht und mittels eines SDS-Gels aufgetrennt. Die Visualisierung der PBP erfolgte anschließend mithilfe des FluorImagers 595 (Molecular Dynamics) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die darauffolgende Coomassie-Färbung diente dem Abgleich der aufgetragenen Lysatmengen.

### 3.22 Immunodetektion von Proteinen - Western Blot

Ein Western Blot dient der Detektion von Proteinen auf einer Membran mittels spezifischer Antikörper. Hierzu wurden die Proteine zunächst über kleine SDS-Gele (10 oder 15 %) elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abschnitt 3.19). Die PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) wurde mit Methanol aktiviert und bis zum Gebrauch in Blotpuffer gelagert (Tabelle 3.35). Alle weiteren Komponenten des Blotaufbaus wurden ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde der Blot wie folgt aufgebaut. Das Trenngel und die Membran wurden luftblasenfrei zwischen je zwei Whatman-Papiere und einen Schwamm gelegt. Nach der Fixierung in einem Gitter wurde das Ganze in eine Blotapparatur (Bio-Rad) geschoben und die dafür vorgesehene Kammer mit Eis gefüllt. Die Membran befindet sich hierbei in Richtung Anode während das Gel zur Kathode zeigt, sodass der negativ geladene SDS-Protein-Komplex vom Gel auf die Membran transferiert wird. Die Kammer wurde mit Blotpuffer gefüllt und die Proteine für 1 h bei 100 V geblottet.

Nach erfolgtem Blot wurde die Membran zum Blockieren der freien Bindestellen für 30 min bei Raumtemperatur in PBST-Puffer geschwenkt (Tabelle 3.35). Die Membran wurde anschließend für 2 min in frischem PBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit der primären Antikörper-Verdünnung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Die Antikörper wurden in PBST verdünnt, wobei der Verdünnungsfaktor spezifisch für jeden Antikörper gewählt wurde. Ungebundener Antikörper wurde durch wiederholtes

Waschen (2 min in PBS, zweimal 5 min in PBST und 2 min in PBS) entfernt bevor die Membran mit dem sekundären Antikörper überschichtet wurde. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich entweder um einen anti-rabbit (1:30.000 in PBST, Sigma) oder einen anti-mouse (1:1.000 in PBST, Sigma) Antikörper. Diese sekundären Antikörper binden spezifisch an den primären Antikörper und sind mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Die Inkubation erfolgte schwenkend für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen zur Entfernung des überschüssigen sekundären Antikörpers (2 min in PBS, zweimal 5 min in PBST und 2 min in PBS) wurde die Membran mit 37°C warmem Blotsubstratpuffer (Tabelle 3.35) äquilibriert. Anschließend folgte die Detektion der spezifischen Antikörperbanden durch die Zugabe von 10 ml, auf 37°C erwärmter Blotfärbelösung (Tabelle 3.35). Die an den sekundären Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase reagiert enzymatisch mit NBT/BCIP, wodurch nach einer Inkubationszeit von 3 bis 10 min ein blaues Substrat entsteht. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membran konnte nach dem Trocknen zur Dokumentation gescannt werden.

**Tabelle 3.35: Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot**

Komponente	Menge/Konzentration
<b>Blotpuffer</b>	
Glycin	36 g
Tris	7,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 5 l
<b>20x PBS (Phosphate buffered saline)</b>	
NaCl	160 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
<b>PBST (PBS/Tween)</b>	
20x PBS	100 ml
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 2 l
<b>Blotsubstratpuffer</b>	
Tris (1 M)	100 mM
NaCl (1 M)	100 mM
MgCl <sub>2</sub> (0,5 M)	5 mM

Komponente	Menge/Konzentration
pH 9,5 mit HCl einstellen, autoklavieren	
<b>Blotfärbelösung</b>	
Blotsubstratpuffer	10 ml
NBT/BCIP (Roche)	60 µl

### 3.23 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Überexpression von Spr0683 und Spr1851 aus *S. pneumoniae* R6 wurden die Gene zunächst mittels PCR mit der iProof-Polymerase und den Primern J54-55 bzw. J56-57 amplifiziert (s. Abschnitt 3.15). Die aufgereinigten PCR-Produkte, welche durch die Verwendung der oben genannten Primer Restriktionsschnittstellen enthalten, und der Vektor pGEX-6P-1 (GE-Healthcare) wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Sa*II verdaut und anschließend ligiert (s. Abschnitte 3.17 und 3.18). Durch diese Klonierung erhielten die Proteine Spr0683 und Spr1851 einen N-terminalen GST-Tag (GST = Glutathion-S-Transferase), welcher eine Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose (GSH = Glutathion, Amersham-Biosciences) ermöglichte. Nach Transformation der klonierten Plasmide in *E. coli* DH5α und Überprüfung mittels Kolonie-PCR sowie einem Kontrollverdau wurden die Plasmide zur Weiterverwendung aus den Zellen isoliert (s. Abschnitt 3.12) und für die Überexpression in *E. coli* BL21 transformiert. Zur weiteren Überprüfung wurden die isolierten Plasmide sequenziert.

Nach einem Vorversuch in kleinem Maßstab folgte die Überexpression der Fusionsproteine. Hierzu wurden zunächst die Stämme *E. coli* BL21 pGEX-6P-1 spr0683 und *E. coli* BL21 pGEX-6P-1 spr1851 über Nacht in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin schüttelnd bei 37°C inkubiert. 1 Liter LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit dieser Vorkultur so angeimpft, dass die OD<sub>600</sub> ca. 0,3 entsprach und weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 1-1,2 wurde der wachsenden Kultur zur Expression der GST-Fusionsproteine IPTG (1 mM, Applichem) zugegeben. Zuvor wurde, zur späteren Überprüfung der Überexpression, eine 500 µl Probe für eine SDS-PAGE entnommen, für 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 80 µl 2x Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 3.34) aufgenom-

men, für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C gelagert. Die Kulturen wurden zur Proteinüberexpression bei 37°C (GST-Spr0683), bzw. 25°C (GST-Spr1851) für 3,5 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde erneut eine 500 µl Probe entnommen und wie zuvor beschrieben behandelt. Die Kultur wurde für 10 min bei 8.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (JA-10 Zentrifugenbecher, Beckmann-Zentrifuge). Das Pellet wurde in 30 ml PBSKMT-Puffer (Tabelle 3.36) resuspendiert und fünfmal für 2 min mit Ultraschall behandelt (Branson sonifier B-12). Das Lysat wurde im Anschluss für 40 min bei 17.000 rpm und 4°C zentrifugiert (JA-20 Zentrifugenbecher, Beckmann-Zentrifuge). Zur Aufreinigung der GST-Proteine wurde der Überstand mit 2 ml GSH-Sepharose, welche zuvor zweimal mit je 30 ml PBSKMT-Puffer gewaschen wurde (Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm, JA-20 Zentrifugenbecher, Beckmann-Zentrifuge), für 1-2 h bei 4°C rollend inkubiert. Zuvor wurden 10 µl des Lysats als Probe entnommen. Das Pellet wurde in 30 ml PBSKMT-Puffer resuspendiert und ebenfalls 10 µl der Probe entnommen. Die Proben wurden mit 10 µl 2x Lämmli-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min aufgekocht und bei -20°C gelagert. Diese Proben dienen der späteren Überprüfung der Löslichkeit der Proteine. Die GSH-Sepharose und der Überstand wurden auf eine Leersäule (Econo-Pac Disposable Chromatography Columns, Bio-Rad) gegeben, der Durchfluss aufgefangen, eine 10 µl Probe entnommen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Säule wurde zweimal mit 20 ml PBSKMT-Puffer und einmal mit 20 ml PBSKM-Puffer (Tabelle 3.36) gewaschen. Die 10 µl Proben des Waschschriffs und des Durchflusses wurden wie bereits beschrieben behandelt. Die an die GSH-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine wurden mit sechsmal 1 ml frisch angesetztem Elutionspuffer (Tabelle 3.36) eluiert. Die Fraktionen wurden einzeln in ERGs aufgefangen. Je eine 5 µl Probe für die SDS-PAGE und 2 µl zur Konzentrationsbestimmung mittels des NanoDrops wurden entnommen, die restliche Fraktion wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proben der Fraktionen wurden ebenfalls mit 2x Lämmli-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bei -20°C gelagert.

Der Puffer der Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden mittels PD-10 Säulen (GE-Healthcare) nach Angaben des Herstellers gegen 1x Bandshift-Puffer (Tabelle 3.37) ausgetauscht. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde der von den aromatischen Aminosäuren des jeweiligen Proteins abhängige Absorptionsfaktor (GST-Spr0683 = 0,75; GST-Spr1851 = 1,07) hinzugezogen.

**Tabelle 3.36: Verwendete Puffer und Lösungen für die Überexpression von GST-Fusionsproteinen**

Komponente	Konzentration
<b>PBSKM-Puffer</b>	
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	3 mM
PBS	1x
<b>PBSKMT-Puffer</b>	
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	3 mM
PBS	1x
Tween 20	0,1 %
<b>Elutionspuffer</b>	
Tris pH 8,0	50 mM
GSH	10 mM

### 3.24 Bandshift Assay

Sogenannte Bandshift Assays, oder auch EMSA (**E**lectro **M**obility **S**hift **A**ssay), beruhen auf der Veränderung der Laufeigenschaften von Protein-gebundenen zu nicht-gebunden Nukleinsäuren bei einer Gelelektrophorese. Anhand der Verlangsamung des Protein-Nukleinsäure-Komplexes zeigt sich ein „shift“, ein Hochrutschen der Nukleinsäurebanden.

In dieser Arbeit wurde ein Vorversuch zur Bindung von GST-Spr0683 an ein 200 nt RNA-Molekül (200 nt Fragment von *lacZ* mit klonierter Promotorsequenz der T7 RNA-Polymerase; mittels T7 RNA-Polymerase *in vitro* synthetisiert; Marx, unveröffentlicht) mithilfe eines Bandshift Assays durchgeführt. Zunächst wurde die RNA-Lösung (20 ng, in 1x Bandshift-Puffer) für 15 min bei 65°C inkubiert und nach langsamem Abkühlen für die Bindung mit verschiedenen Mengen des Proteins GST-Spr0683 in einem Gesamtansatz von 15 µl 1x Bandshift-Puffer (Tabelle 3.37) für 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 6x Bandshift-Probenpuffer zugegeben und der gesamte Ansatz nach einem 15-minütigem Vorlauf des nicht-denaturierenden 8 %-igen TGE-Polyacrylamidgels (Tabelle 3.38) in die Taschen gegeben. Hier wurden Mini-Protean 3 Gelapparaturen (Bio-Rad) und 1x TGE-Puffer

als Laufpuffer verwendet. Als Marker wurde der Generuler 100 bp-Marker der Firma Fermentas verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese für ca. 1 h bei 100 V und Raumtemperatur wurde das Gel 20 min in einer SYBR Gold-Lösung (Invitrogen) schüttelnd inkubiert und dokumentiert (Wellenlänge: 488 nm, FluorImager 595, Molecular Dynamics).

**Tabelle 3.37: Verwendete Puffer und Lösungen für Bandshift Assays**

Komponente	Menge/Konzentration
<b>1x Bandshift-Puffer</b>	
HEPES	20 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM
DTT	1 mM
KCl	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
pH 7,9 einstellen, sterilfiltrieren	
<b>DTT 1 M (Dithiothreitol)</b>	
DTT	772,5 mg
Na-Acetat (3 M; pH 5,0)	16,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 5 ml
sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20°C lagern	
<b>TGE-Puffer (5x)</b>	
Tris	250 mM
Glycin	2 M
EDTA	8,65 mM
<b>6x Bandshift-Probenpuffer</b>	
TBE-Puffer (s. Tabelle 3.31)	0,15x
Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0,2 %
pH 7,9 einstellen	

**Tabelle 3.38: Zusammensetzung eines TGE-Polyacrylamidgels (8 %)**

Komponente	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5,25 ml
30 % AA:0,8 % BAA (Gel 30, Carl Roth)	2,7 ml
5x TGE-Puffer	2 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED (Sigma-Aldrich)	5 µl

Die Zusammensetzung bezieht sich auf ein kleines Gel.

### 3.25 Microarray-Analyse

Mithilfe eines Microarrays können in paralleler Analyse eine Vielzahl von Veränderungen ermittelt werden. Die verschiedenen Formen dieser Technologie ermöglichen es, zum Beispiel ganze Genome miteinander zu vergleichen (DNA-Microarray) oder, im Falle einer Transkriptomanalyse, unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren. Allerdings wird jedes Gen lediglich durch ein 70-mer Oligonukleotid, welche auf dem Microarray-Slide immobilisiert sind, dargestellt. Es können also nur Aussagen über die Veränderung dieses Genbereichs getroffen werden. Die Methode beruht auf der Hybridisierung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Nukleinsäuren eines Referenzstammes und des zu untersuchenden Stammes. Während für einen DNA-Microarray chromosomale DNA eingesetzt wird, erfordert die Transkriptomanalyse eine reverse Transkription der Gesamt-RNA in cDNA (komplementäre DNA). Die anschließende Detektion der Signalstärken beider Fluoreszenzstoffe spiegelt die Hybridisierung der entsprechenden DNA/cDNA wider. Durch eine quantitative bioinformatische Auswertung können so bei DNA-Microarrays Unterschiede im Genom festgestellt werden, welche zum Beispiel durch die Rekombination heterologer DNA entstanden sind. Bei einer Transkriptomanalyse weisen unterschiedliche Hybridisierungssignale auf ein verändertes Transkriptionsniveau eines Gens hin.

In dieser Arbeit wurden DNA-Microarrays zur Analyse von Transformationsexperimenten mit chromosomaler DNA durchgeführt. Des Weiteren wurden die Transkriptionsprofile einzelner Transformanten untersucht.



### 3.25.1 Verwendete Oligonukleotid-Sets

#### 3.25.1.1 Das *S. pneumoniae* R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set

In dieser Arbeit wurde ein Oligonukleotid-Set verwendet, welches in Kooperation mit der Firma Eurofins MWG Operon entwickelt wurde (<http://nbc3.biologie.uni-kl.de/>). Die 70mer Oligonukleotide besitzen einen 5'-AminoC6-Linker, wodurch sie eine kovalente Bindung mit den Epoxy-beschichteten Slides eingehen können. Für DNA-Microarrays wurden verspiegelte (Nexterion® HiSense Slide E, Schott), für die Transkriptomanalyse unverspiegelte Slides (Nexterion® Slide E, Schott) verwendet. Das Set beinhaltet 2038 Oligonukleotide für in R6 und TIGR4 annotierte Gene sowie 309 TIGR4-spezifische Gene. Zudem werden durch die Oligonukleotide 328 nicht-kodierende intergene Bereiche von R6 und 160 von TIGR4 abgedeckt. Des Weiteren handelt es sich um 44 spezifische Oligonukleotide für repetitive Elemente, *pbp2x* aus *S. pneumoniae* 2349 sowie tRNAs (Transfer RNA) und rRNAs (ribosomale RNA). Hinzu kommen 84 diverse Oligonukleotide, die als Negativ-, Positiv- und Stringenz-Kontrollen dienen. Alle Oligonukleotide wurden in Spotting-Puffer mit einer Endkonzentration von 10 µM gelöst (Tabelle 3.39), auf neun Mikrotiterplatten verteilt und in doppelter Ausführung auf die Slides gespottet. Die Lagerung der versiegelten Platten (SealPlate, EXCEL Scientific) erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 3.39: Zusammensetzung des Spotting-Puffers**

Komponente	Konzentration
<b>SSC (3x)</b>	
NaCl	0,45 M
Na-Citrat	45 mM
pH 7,0 einstellen	
<b>Betain</b>	1,5 M

### 3.25.1.2 Das *S. mitis* B6-Oligonukleotid-Set

Das *S. mitis* B6-Oligonukleotid-Set wurde auf der Grundlage des in der Abteilung Mikrobiologie der TU Kaiserslautern sequenzierten und annotierten Genoms (Denapaite *et al.*, 2010) dieses Stammes designt. Diese 70mer-Oligonukleotide besitzen ebenfalls einen 5'-AminoC6-Linker und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt (<http://nbc3.biologie.uni-kl.de/>). Dieses Set beinhaltet 1978 genespezifische und 461 intergenische Oligonukleotide. Hinzu kommen 50 Oligonukleotide für RNAs und repetitive Elemente. Als diverse Kontrollen dienen 171 Oligonukleotide (s. Abschnitt 3.25.1.1). Die Lagerung der B6-Oligonukleotide erfolgte wie in Abschnitt 3.25.1.1 beschrieben.

### 3.25.2 Herstellung der Microarray-Slides

Zur Herstellung der Microarray-Slides wurde das sogenannte Kontaktverfahren verwendet. Hierbei werden die Oligonukleotide mithilfe von 32 Mikrospottingpins (SMP3-Pin, Telechem) durch den direkten Kontakt mit der Epoxy-beschichteten Oberfläche auf die Slides übertragen. Für das sogenannte Spotting wurde das SpotArray™ Microarray Spotting System BioChip Technologies (Packard BioSciences) und die dazugehörige Software SpotArray™ der Firma PerkinElmer verwendet. Zur späteren Auswertung wurde vor dem Spotten eine gal-Datei erstellt, in der jedes Oligonukleotid einer bestimmten Position auf dem Slide zugeordnet wird. Die Slides wurden mit einem Diamantstift beschriftet und mittels Druckluft von Staubpartikeln befreit. Zusätzlich zu den Spotting-Slides wurden vier mit Ethanol gereinigte Objektträger, sogenannte Blocking-Slides, zum Abtupfen der Pins in die Spottingkammer gelegt. Die relative Luftfeuchtigkeit (relative humidity = RH) während des Spotting-Vorgangs betrug 50-70 %. Die in den Mikrotiterplatten befindlichen Oligonukleotide wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 1 min bei 800 rpm zentrifugiert (Hermle Z 513 K). Mithilfe der Software SpotArray™ wurden folgende Parameter des „Spot Array Printing Protocols“ eingestellt (Tabelle 3.40).

**Tabelle 3.40: Spotting Protokoll der Spot-Array™ Software**

Parameter	R6/TIGR4 Oligonukleotid- Set	B6 Oligonukleotid- Set
Anzahl der Platten pro Plattenwechsel	3	4
Barcodelesen der Platten	nein	nein
Barcodelesen der Substrate	nein	nein
Anzahl der Vordrucke nach jeder Probenbeladung	10	10
Vordruck Spot-Abstand, Mitte zu Mitte	390 µm	500 µm
Anzahl der Drucke jeden Spots pro Array	2	2
Nenn Durchmesser der Spots	150 µm	150 µm
Spot-Abstand, Mitte zu Mitte	281 µm	300 µm
Lage des Array auf dem Substrat	Mitte	Mitte
Freifläche für Barcode/Label am Ende	ja	ja
Anfahrgeschwindigkeit des Drucks	10 mm/s	10 mm/s
Abfahrgeschwindigkeit des Drucks	10 mm/s	10 mm/s
Nachlauf des Drucks	0 µm	0 µm
Haltezeit des Drucks	400 ms	400 ms
Nachlauf der Probenbeladung	100 µm	100 µm
Haltezeit der Probenbeladung	2300 ms	2500 ms
Substratstärke	1,1 mm	1,1 mm
Maximale Anzahl der Spots pro Probenbeladung	120	120
Druckkopf-Geschwindigkeit, X-Y Bewegung	schnell	schnell
Dauer der Waschprozedur	6 s	6 s
Anzahl der Waschzeiten	4	4
Länge der Trockenprozedur nach dem Waschen	3 s	3 s
Nicht drucken falls Luftfeuchtigkeit außerhalb des zulässigen Bereichs liegt	ja	ja
Minimal akzeptierte Luftfeuchtigkeit	50 % RH	50 % RH
Maximal akzeptierte Luftfeuchtigkeit	70 % RH	70 % RH
Kontrolle des Luftfeuchtigkeitsniveaus während der Druckprozedur	ja	ja
Angestrebte Luftfeuchtigkeit	65 % RH	65 % RH
Nicht drucken falls Temperatur außerhalb des zulässigen Bereichs liegt	ja	ja

Eigene Übersetzung des Originalprotokolls; RH = relative humidity

Nach Beendigung des Spotting-Vorgangs wurden die Slides für 30 min in einer feuchten Kammer gelagert und im Anschluss für 1 h bei 85°C inkubiert. Diese Behandlung der Slides bewirkt eine Immobilisierung der Oligonukleotide mittels

kovalenter Bindung der 5'-AminoC6-Linker an die Epoxy-Schicht der Slides. Die Lagerung erfolgte staubgeschützt in Objektträger-Boxen bei Raumtemperatur.

### **3.25.3 Markierung der Nukleinsäure mit Fluoreszenzfarbstoffen**

#### **3.25.3.1 Fluoreszenzmarkierung von chromosomaler DNA**

Zur Untersuchung genomischer Veränderungen nach Transformationen wurde zunächst die chromosomale DNA des Referenzstammes und des zu untersuchenden Stammes isoliert (s. Abschnitt 3.13). Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die mit den Cyanin-Farbstoffen Cy5 und Cy3 (PerkinElmer) gelabelten dCTPs mithilfe des Klenow-Enzyms (Invitrogen) aus *E. coli* in die DNA eingebaut. Hierzu wurden sogenannte Random Primer (Invitrogen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Mischung zufällig gewählter Hexamere, wodurch viele Sequenzen abgedeckt werden können. Durch die Verwendung des Klenow-Enzyms, der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I, werden während der Elongation unter anderem die modifizierten dCTPs in die DNA eingefügt. Während die DNA des einen Stammes mit Cy5 markiert wird, welches bei einer Wellenlänge von 670 nm (rot) fluoresziert, wird der zweite Stamm mit Cy3 markiert, welches bei 570 nm (grün) fluoresziert. Durch die unterschiedlichen Emissionsspektren dieser Fluorophore können so unterschiedliche Hybridisierungssignale der zu untersuchenden DNA-Proben detektiert werden.

Hierzu wurden 4 µg genomische DNA (s. Abschnitt 3.13) in einem Volumen von 11 µl für 10 min bei 100°C im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer) denaturiert. Nach zehnmütiger Abkühlung auf Eis wurde der in Tabelle 3.41 aufgelistete Reaktionsansatz zusammenpipettiert und über Nacht bei 37°C lichtgeschützt inkubiert.

**Tabelle 3.41: Reaktionsansatz zur Fluoreszenzmarkierung von chromosomaler DNA**

Komponente	Menge (µl)
chromosomale DNA (4 µg)	11
dNTP-Mix (10x, 1 mM dATP, dGTP, dTTP und 0,5 mM dCTP)	2
Random Primer (3 µg/µl)	2,7
Klenow-Enzym Reaktionspuffer (10x)	2
Klenow-Enzym (9 U/µl)	1,3
Cy5- bzw. Cy3-dCTP (1 mM)	1

Nach erfolgter Inkubation wurde zunächst die Reaktion des Klenow-Enzyms durch die Zugabe von 3 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8,0) gestoppt. Im Anschluss erfolgte eine Ethanol-Präzipitation zur Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten DNA. Hierzu wurde die DNA mit 1 ml eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt und für 30 min bei -20°C gefällt. Nach erfolgter 20-minütiger Zentrifugation bei 20.000 rpm und 4°C (Heraeus Sepa tech Biofuge 28RS, Heraeus Instruments) wurde dem Pellet 1 ml eiskaltes Ethanol (70 %) zugegeben und die DNA für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Pellet in der SpeedVac getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 3.25.3.2 Fluoreszenzmarkierung von Gesamt-RNA

Zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene wurde zunächst die Gesamt-RNA des Referenzstammes und des zu untersuchenden Stammes isoliert (s. Abschnitt 3.14). Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die in Abschnitt 3.25.3.1 bereits beschriebenen Cy5- und Cy3-gelabelten dCTPs verwendet, welche durch die Reaktion der reversen Transkriptase in die neu synthetisierte cDNA eingefügt wurden.

Zur statistischen Auswertung wurden für jede Transkriptomanalyse vier Microarray-Slides hybridisiert. Zum einen wurde ein sogenannter Dye-swap, also das Vertauschen der Cyanin-Farbstoffe derselben RNA-Präparationen, durchgeführt. Zum anderen wurde eine Wiederholung inklusive Dye-swap mit einer zweiten RNA-Präparation beider Stämme durchgeführt. Für die Hybridisierung eines Microarray-Slides wurden 54 µg RNA eines Stammes eingesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung sowie die anschließende Aufreinigung der cDNA wurden nach Herstellerangaben

mithilfe des LabelStar™ Array Kits (Qiagen) durchgeführt. Es wurden Random Primer (Oktamere) in einer Endkonzentration von 2 µM der Firma MWG verwendet. Im Anschluss an die Elution der fluoreszenzmarkierten cDNA mit 30 µl Elutionspuffer (LabelStar™ Array Kits, Qiagen) wurde die Flüssigkeit mithilfe der SpeedVac eingetrocknet und das Pellet bei -20°C gelagert.

### 3.25.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Microarray-Slides wurde mit zwei Hybridisierstationen der Firma Tecan durchgeführt (HS400, HS400 Pro). Dabei binden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte DNAs bzw. cDNAs unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken an die auf den Slides immobilisierten homologen Sequenzen der Oligonukleotide.

Die markierten Nukleinsäuren wurden zunächst in je 55 µl Hybridisierungspuffer (Tabelle 3.42) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden die unterschiedlich markierten Proben des Referenzstammes und des zu untersuchenden Stammes vermischt und erneut für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Probenmischung wurde nach erfolgter Prähybridisierung injiziert. Das verwendete Hybridisierungsprotokoll ist Tabelle 3.43 zu entnehmen. Im Anschluss an die 16-stündige Hybridisierung wurden die Slides trocken und lichtgeschützt gelagert. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.42 aufgelistet.

**Tabelle 3.42: Verwendete Puffer für die Hybridisierung**

Komponente	Konzentration
<b>SSC (20x)</b>	
NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
<b>Prähybridisierungspuffer</b>	
SSC	4x
SDS	0,1 %
BSA (sterilfiltriert)	0,1 mg/ml
<b>SDS (0,1 %)</b>	0,1 %

Komponente	Konzentration
<b>SSC/SDS</b>	
SSC	2x
SDS	0,1 %
<b>SSC (1x)</b>	1x
<b>SSC (0,1x)</b>	0,1 %
<b>Hybridisierungspuffer</b>	
Nexterion Hyb (PeqLab)	1 Volumenanteil
Formamid	1 Volumenanteil
Lagerung bei -20°C	

**Tabelle 3.43: Hybridisierungsprotokoll**

Schritt	Komponente	Waschzeit	Einwirkzeit	Temperatur (°C)	Zyklen
Waschen	SDS (0,1 %)	30 s	30 s	25	
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	30 s		25	
Waschen	Prähybridisierungspuffer	10 s	30 min	42	
Waschen	Prähybridisierungspuffer	20 s		40	
Probeninjektion				40	
Hybridisierung			16 h	40	
Waschen	SSC/SDS	1 min	30 s	30	2
Waschen	SSC (1x)	1 min	30 s	30	2
Waschen	SSC (0,1x)	1 min	30 s	30	
Trocknen			2 min	30	

### 3.25.5 Datenerfassung der Microarrays

#### 3.25.5.1 Scannen der hybridisierten Microarray-Slides

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgte mithilfe eines Laserscanners (ScanArray® GX, Microarray, PerkinElmer). Durch Anregung der Cy3-markierten Nukleinsäure bei einer Wellenlänge von 543 nm und der Cy5-markierten Nukleinsäure bei 633 nm wurden die Emissionsspektren beider Fluorophore gemessen. Zum Scannen wurde die ScanArray® Express Software Version 4.0 (PerkinElmer) verwendet. Zunächst erfolgte das Scannen mit der EasyScan-Option bei einer

niedrigen Auflösung von 50  $\mu\text{M}$ . Dieser Scanvorgang diente der Einstellung der Photomultiplier Tube Stärke (PMT) um die gleichen Signalintensitäten beider Fluoreszenzkanäle zu erreichen. Mit dem so ermittelten PMT-Wert wurden die Slides anschließend mit einer höheren Auflösung von 10  $\mu\text{M}$  gescannt und für beide Fluoreszenzkanäle eine tif-Datei erzeugt.

### 3.25.5.2 Bioinformatische Datenanalyse

Die bioinformatische Analyse der Microarray-Daten erfolgte ebenfalls mit dem Programm ScanArray® Express. Hierzu wurden zunächst die tif-Dateien beider Fluoreszenzkanäle überlagert, wodurch ein sogenanntes „Composite“-Bild (Kombinationsbild) entstand. Zudem wurde die beim Spotting erzeugte gal-Datei benötigt, welche die Zuordnung jedes Oligonukleotids zu einer Position auf dem Slide darstellt. Eine Optimierung wurde in einzelnen Fällen mithilfe der Filter 3x3-Median oder „Black threshold“ (Schwärzungsgrad) erreicht. Die Quantifizierung erfolgte mit der Einstellung „Easy Quant“. Hier wurden die Adapted circle-Methode und die Auto find spots-Funktion verwendet. Die Normalisierung erfolgte mittels der LOWESS-Methode (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing, Yang *et al.*, 2001). Nach Zuordnung der Spots zu den entsprechenden Genen mittels der gal-Datei wurde das Ergebnis der Quantifizierung als csv-Datei gespeichert und in Excel weiter bearbeitet. Zunächst wurden alle Kontrollspots überprüft und anschließend aus der Ergebnisliste entfernt. Die Werte der nicht gefundenen Oligonukleotide oder solcher, die eine schlechte Qualität aufwiesen, wurden ebenfalls nicht ausgewertet. Zur Auswertung wurden mehrere Hybridisierungen in Betracht gezogen. Für DNA-Microarrays wurden aufgrund der zweifachen Anwesenheit jedes Oligonukleotids pro Slide sowie des Dye-swaps vier Werte je Oligonukleotid ermittelt. Bei der Transkriptomanalyse wurde zusätzlich eine Wiederholung inklusive Dye-swap durchgeführt, wodurch sich acht Werte für jedes Oligonukleotid ergaben. Zur weiteren Analyse wurden die im Folgenden beschriebenen Anwendungen des Nano + Bio Centers der TU Kaiserslautern verwendet (<http://nbc3.biologie.uni-kl.de/>). Zunächst wurden mithilfe der Global Loess-Normalisierung (Smyth und Speed, 2003) aus den Signalintensitäten beider Fluoreszenzkanäle die normalisierten Verhältnisse der Intensitäten (Normalized Ratios) berechnet und mittels T-Test (Zweistichprobentest) auf ihre Signifikanz untersucht (Limpert *et al.*, 2001). Die ermittelten Daten, der



Mittelwert der normalisierten Intensitätsverhältnisse (Average = AVG) und der P-Wert (p-value) wurden zur Analyse der Hybridisierungen verwendet. Als signifikant wurden generell Gene bezeichnet, die einen Mittelwert kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 sowie einen P-Wert kleiner oder gleich 0,03 besaßen. In einzelnen Experimenten erfolgte eine entsprechende Anpassung dieser Werte.

### 3.26 Konstruktion von *Streptococcus pneumoniae* Derivaten

#### 3.26.1 Konstruktion der CCCO Stämme mit verschiedenen *murM* Allelen

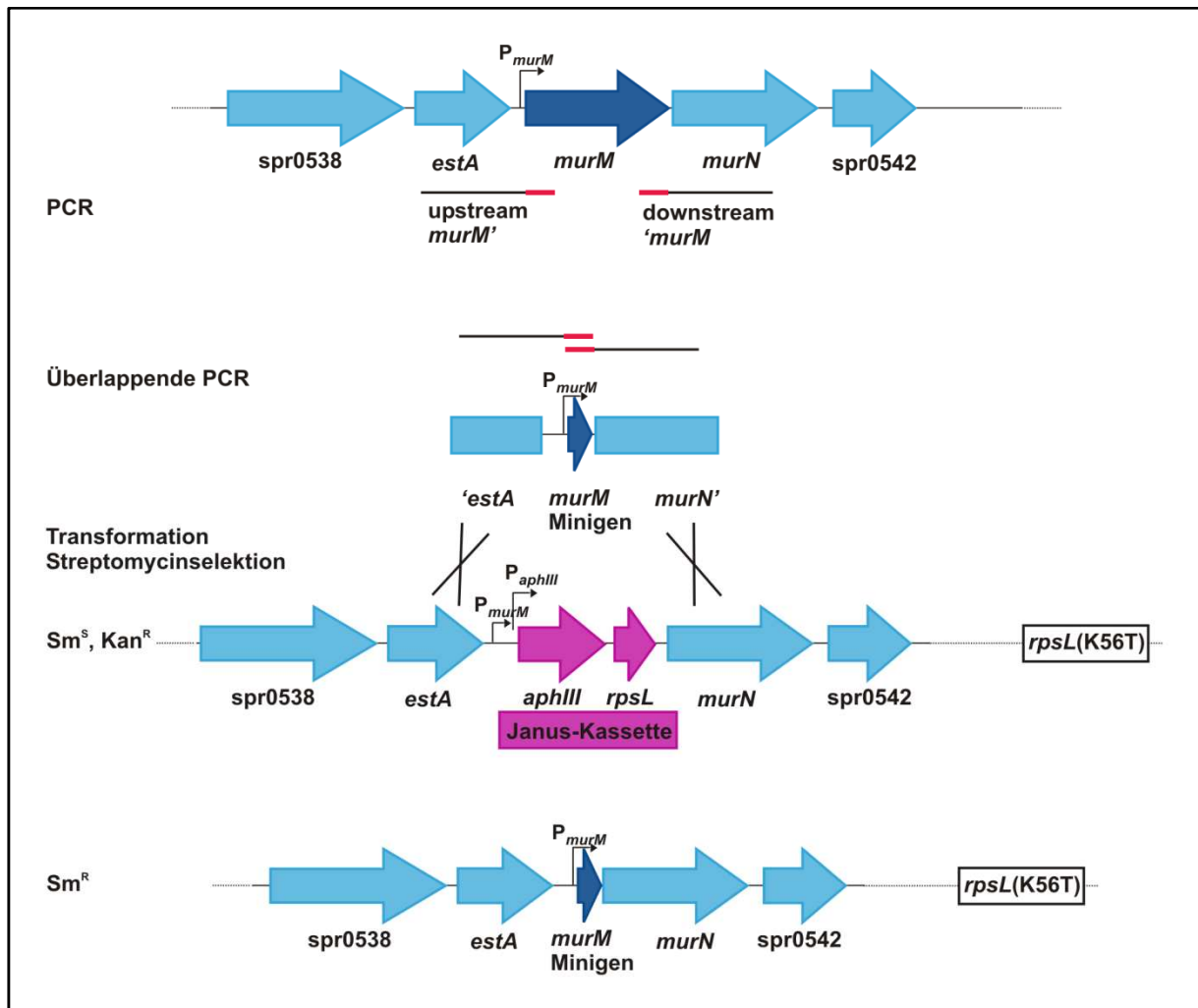
Um den Einfluss verschiedener *murM* Allele auf die  $\beta$ -Lactamresistenz vergleichend untersuchen zu können wurden die Allele in den gleichen genetischen Hintergrund eingebracht. Mithilfe der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) konnte ein Austausch des *murM* Gens in CCCO hergestellt werden. Neben dem Kanamycinresistenzgen *aphIII* beinhaltet die Janus-Kassette das *rpsL* Wildtypgen, welches eine dominante Sensitivität gegenüber Streptomycin verleiht. Der Einsatz der Janus-Kassette erforderte den vorangegangenen Austausch des chromosomalen *rpsL* gegen das *rpsL41* Allel (Salles *et al.*, 1992), welches dem verwendeten Stamm aufgrund der K56T Mutation Streptomycinresistenz verleiht. Unter dieser Voraussetzung konnte das Einbringen der Janus-Kassette mittels Kanamycin und das Entfernen der Kassette mittels Streptomycin selektioniert werden. Der Austausch eines Gens mittels der Janus-Kassette verläuft somit in zwei selektionierbaren Schritten. Zunächst wurde *rpsL* (K56T) in den Stamm CCCO eingebracht. Anschließend wurde die Janus-Kassette mittels Kanamycinselektion anstelle von *murM* ins Genom integriert. Hierbei befindet sich der Anfang der Kassette am Startcodon, das Ende am Stoppcodon des *murM* Gens. Die Janus-Kassette mit den flankierenden DNA-Bereichen 770 bp upstream und 736 bp downstream von *murM* wurde mit den Primern PM263 und J2 aus dem Stamm R6<sub>murE 2x 2b 1a</sub>  $\Delta murM$  (Frohnweiler, 2009) amplifiziert und transformiert. Der so erhaltene Stamm CCCO*murM::janus* (Sm<sup>S</sup>, Kan<sup>R</sup>) diente sowohl zur Integration verschiedener *murM* Allele als auch zur Konstruktion des Deletionsderivat mittels des *murM*-Minigens ( $\Delta AS13-395$ ) als

Ausgangsstamm. Die *murM* Allele aus *S. mitis* B6 und CCCB wurden mit den Primern J4 und J5 amplifiziert, welche homologe Überhänge zu den Primern für die Amplifikation der up- und downstream Bereiche der *murM*-Region aufweisen. Diese Bereiche wurden mit den Primern PM263 und J3 bzw. J6 und J2 aus CCCO amplifiziert. Zur Amplifikation des *murM* Gens aus *S. pneumoniae* Hu17 dienten die Primer J7 und J8. Der upstream Bereich aus CCCO mit den entsprechenden homologen Überhängen wurde mit PM263 und J3 generiert, während für den downstream Bereich die Primer J10 und J2 verwendet wurden. In einer dritten überlappenden PCR (s. Abschnitt 3.15.1) wurden die *murM* Allele mit den passenden flankierenden Regionen zusammengefügt. Die so entstandenen Fragmente wurden in die jeweiligen CCCO *murM::janus* Stämme transformiert und auf Streptomycin selektioniert. Die Planung der Konstrukte erfolgte mithilfe der Software Clone Manager Professional Suite (Sci Ed Central).

### **3.26.2 Konstruktion der Deletionsderivate CCCO $\Delta$ *murM* und CCCO *murMN::janus***

Als Rezipient zur Herstellung des *murM*-Minigens diente der in Abschnitt 3.26.1 beschriebene Stamm CCCO *murM::janus*. Zunächst wurden zwei PCR-Fragmente aus R6 generiert. Das Fragment des upstream-gelegenen Bereichs von *murM* beinhaltet zusätzlich die ersten 36 Basen des Gens und wurde mit PM263 und J24 amplifiziert. Die Primer J25 und J2 dienten der Herstellung des zweiten Fragments, welches aus den letzten 36 Basen von *murM* und der downstream-Region des Gens besteht. Die Primer J24 und J25 sind homolog und ermöglichen so die Amplifizierung der zwei 835 und 802 bp großen Fragmente mithilfe einer überlappenden PCR und den Primern PM263 und J2. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt transformiert. Das so entstandene Deletionsderivat CCCO  $\Delta$ *murM* besitzt ein funktionsloses Minigen des ursprünglichen Gens *murM*. Abbildung 3.1 zeigt die Konstruktion des Stammes CCCO  $\Delta$ *murM*.

Zusätzlich zur Deletion von *murM* wurde das Operon *murMN* mithilfe der Janus-Kassette deletiert. Hierzu wurde die Janus-Kassette mit den flankierenden Regionen des *murMN*-Operons aus dem Stamm R6<sub>murE 2x 2b 1a</sub>  $\Delta$ *murMN* (Frohnweiler, 2009) mit den Primern PM263 und PM264 amplifiziert und in CCCO transformiert.



**Abbildung 3.1: Konstruktion des *murM*-Minigen in CCCO mithilfe der Janus-Kassette**

Das Gen *murM* ist dunkelblau dargestellt, die flankierenden Gene hellblau. Zunächst wurden die PCR-Reaktionen für die flankierenden Bereiche mit je einer kurzen Sequenz von *murM* durchgeführt. Diese Fragmente konnten durch die Verwendung homologer Primer (rote Linien) mittels einer überlappenden PCR zu einem Fragment zusammengefügt werden. Im Anschluss erfolgte eine Transformation in den Stamm CCCO *murM::janus*. In diesen Stamm wurde zuvor die Janus-Kassette (magenta) anstelle von *murM* in das Genom integriert. Die Selektion erfolgte mit Streptomycin aufgrund der übertragenen Resistenz durch das anfangs eingeführte *rpsL(K56T)*-Allel. Das so entstandene Deletionsderivat CCCO  $\Delta murM$  enthält ein *murM*-Minigen ( $\Delta AS13-395$ ) an der ursprünglichen Stelle des Gens *murM*. Die Promotoren von *murM* und *aphIII* sind ebenfalls aufgeführt (P, schwarzer Pfeil).

### 3.26.3 Konstruktion der Deletionsderivate R6 $\Delta$ spr0683 und CCCB $\Delta$ spr0683

Zur Deletion des Gens spr0683 wurde die Spectinomycin-Resistenzkassette (*aad9*) verwendet. Das Konstrukt wurde so hergestellt, dass die Resistenzkassette anstelle des Startcodons von spr0683 beginnt und an dessen Stoppcodon endet. Hierbei steht das Gen *aad9* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors.

Die Spectinomycin-Resistenzkassette wurde mit den Primern PM149 und PM167 aus dem Stamm R6 *ciaR::aad9* (Mascher *et al.*, 2003) amplifiziert. Zur Integration der Kassette in das Genom wurden mit den Primern J34 und J35 sowie J36 und J37 up- und downstream-Fragmente aus *S. pneumoniae* R6 amplifiziert. Die in den Primern PM149 und J35 enthaltene *SalI*-Schnittstelle bzw. die *NotI*-Schnittstellen der Primer PM167 und J36 dienten der Fusion der drei Fragmente mittels T4 DNA Ligation (s. Abschnitt 3.18). Das so entstandene Fragment wurde in R6 und CCCB transformiert und auf Spectinomycin selektioniert.

### 3.26.4 Konstruktion verschiedener Deletionen von spr1851 in R6 und CCCB

Das Gen spr1851 wurde mithilfe der in Abschnitt 3.26.1 beschriebenen Janus-Kassette in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 und CCCB deletiert. Hierzu wurden die 744 bp bzw. 766 bp großen up- und downstream-Fragmente aus R6 mit den Primern J29 und J48 bzw. J49 und J33 hergestellt. Die Amplifikation der Janus-Kassette aus dem Stamm CCCO *murMN::janus* erfolgte mit den Primern janus\_f und janus\_r, deren Sequenzen homologe Überhänge der Primer J48 und J49 darstellen. Durch die anschließende überlappende PCR wurden die Fragmente fusioniert und transformiert.

Die so entstandenen Deletionsderivate R6 spr1851::*janus* und CCCB spr1851::*janus* dienten als Ausgangsstämme für die Integration eines Minigens von spr1851 ( $\Delta$ AS13-317) anstelle der Janus-Kassette. Hierzu wurden zwei Fragmente, welche die jeweils flankierenden DNA-Regionen von spr1851 sowie die ersten 36 bzw. letzten 36 Basen des Gens enthielten, hergestellt. Diese Fragmente wurden mit den Primern J29 und J59 bzw. J58 und J30 aus R6 amplifiziert. Mittels der homologen Primer J58 und J59 wurde mit einer überlappenden PCR ein einzelnes Fragment

generiert und nach erfolgter Transformation die Stämme R6  $\Delta$ 1851 und CCCB  $\Delta$ 1851 hergestellt.

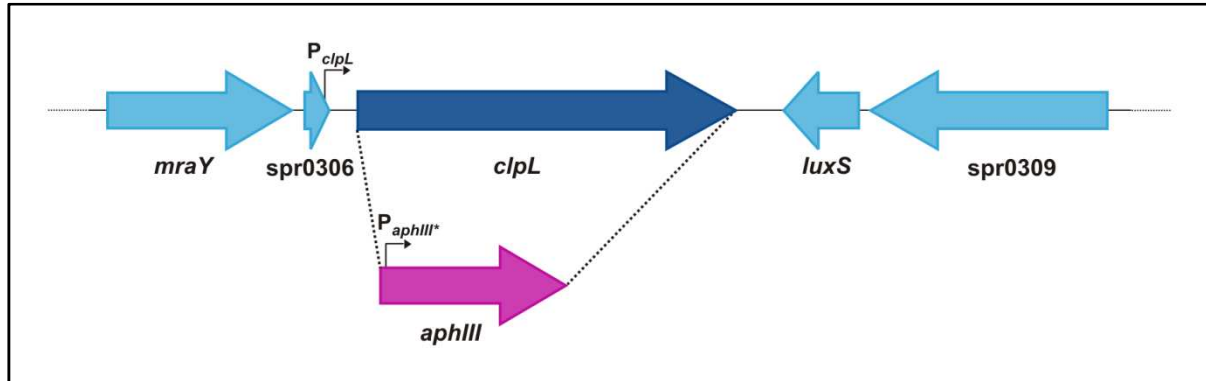
### 3.26.5 Konstruktion der Transformante CCCB smi0217

Zur Substitution von spr1851 mit dem homologen Gen smi\_0217 aus *S. mitis* B6 wurde ebenfalls die Janus-Kassette verwendet. Hierzu wurden zunächst zwei up- und downstream-Fragmente zur späteren homologen Rekombination amplifiziert. Das 740 bp große upstream-Fragment wurde mit den Primern J29 und J50 generiert. Die Primer J53 und J33 dienten der Amplifikation eines 758 bp großen downstream-Fragments. Das Gen smi\_0217 wurde mit den Primern J51 und J52 aus *S. mitis* B6 amplifiziert. Diese Primer weisen zu weiten Teilen homologe Sequenzen zu den Primern J50 und J53 auf. Dadurch konnten die drei Einzelfragmente mittels einer überlappenden PCR fusioniert werden. Das so erhaltene DNA-Fragment wurde anschließend in den Stamm CCCB spr1851::*janus* unter Streptomycinselektion transformiert. In diesen Stamm war zuvor die Janus-Kassette anstatt des Gens spr1851 ins Genom integriert worden (s. Abschnitt 3.26.4).

### 3.26.6 Konstruktion der *clpL* Deletion in R6 und CCCB

Zur Inaktivierung des Gens *clpL* wurde eine Kanamycin-Resistenzkassette (*aphIII*) verwendet. Aufgrund der verschiedenen genetischen Hintergründe von R6 und CCCB, in denen *clpL* deletiert werden sollte, wurden zwei upstream-Fragmente für die Klonierung hergestellt. In beiden Fällen dienten die Primer J60 und J64 der Amplifikation der upstream-Region. Als Template-DNA diente hierbei zum einen DNA von *S. pneumoniae* R6 und zum anderen DNA von CCCB. Das entstandene PCR-Produkt entsprach für R6 einer Größe von 1005 bp, während das CCCB upstream-Fragment 1038 bp betrug. Das 1033 bp große downstream-Fragment konnte für beide Konstrukte verwendet werden. Es wurde mit den Primern J65 und J61 aus R6 amplifiziert. Das Kanamycinresistenzgen *aphIII* wurde aus einem genetisch modifizierten pGEM®-T Easy Plasmid (Promega; Marx, unveröffentlicht) mit den Primern J62 und J63 amplifiziert. Hierbei handelt es sich um Modifikationen zur Verbesserung der Promotor- und Terminatorsequenzen (Marx, unveröffentlicht) im

Vergleich zur ursprünglichen Version des *aphIII* Gens aus der Janus-Kassette. Nach erfolgter überlappender PCR konnten die Konstrukte in die jeweiligen Ausgangsstämme mit R6- oder CCCB-Hintergrund transformiert werden.



**Abbildung 3.2: Deletion von *clpL* in *S. pneumoniae* R6**

Das Gen *clpL* ist dunkelblau dargestellt, die flankierenden Gene hellblau. Die Kanamycin-Resistenzkassette (Pfeil, magenta) ersetzt mit *aphIII* das Gen *clpL*. Die Promotoren von *aphIII* und *clpL* sind ebenfalls dargestellt (P, schwarzer Pfeil). Der modifizierte Promotor von *aphIII* (Marx, unveröffentlicht) ist anhand des Sterns gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

Horizontaler Gentransfer zwischen verwandten Spezies führt unter anderem zur Entstehung von PBP-Mosaikgenen, welche eine verringerte Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamen vermitteln (Chalkley und Koornhof, 1990; Chalkley *et al.*, 1991; Dowson *et al.*, 1993; Sibold *et al.*, 1994). Unter Laborbedingungen entstanden nach mehreren Transformationen von *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA von *S. mitis* B6 und Selektion auf steigenden Antibiotikakonzentrationen Mutanten, in denen sukzessive PBP ausgetauscht worden sind (Hakenbeck *et al.*, 1998). Bei den ersten drei Selektionsschritten mit Cefotaxim wurden die Stämme R6 C<sub>T3</sub>, R6 CC<sub>T1</sub> sowie im dritten Schritt R6 CCC<sub>T2</sub> und R6 CCC<sub>T5</sub> isoliert. Die Stämme der vierten Selektionsstufe mit Oxacillin (CCCO) bzw. Benzylpenicillin (CCCB) weisen niedrig-affine Varianten aller fünf hochmolekularen PBP auf. Zudem konnte bei diesen Stämmen eine sehr hohe  $\beta$ -Lactamresistenz festgestellt werden (Hakenbeck *et al.*, 1998).

Neben den Mutationen in verschiedenen PBPs, die zur Resistenz führen, sind bisher erst wenige nicht-PBP-Resistenzdeterminanten bekannt. Hierbei handelt es sich um die Glycosyltransferase CpoA (Grebe *et al.*, 1997), die Histidinkinase CiaH (Guenzi *et al.*, 1994) und das Enzym MurM, welches die Synthese der Interpeptidbrücke zwischen den Muropeptiden katalysiert (Smith und Klugman, 2001). MurE, eine Aminosäure-Ligase, die ebenfalls an der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt ist, wurde vor kurzem als neue Resistenzdeterminante identifiziert (Todorova, 2010).

Anhand von DNA-Microarray-Analysen wurde ein genomischer Vergleich der Transformanten aus der zweiten, dritten und vierten Selektionsstufe (R6 CC<sub>T1</sub>, R6 CCC<sub>T5</sub>, sowie CCCO und CCCB) durchgeführt (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Dadurch wurde ersichtlich, dass CCCB, die Transformante mit der höchsten Resistenzentwicklung, mindestens 28 veränderte Genloci aufweist. Hierbei handelt es sich neben den Genen der hochmolekularen PBP und deren umgebenden Regionen um Gene, die über das gesamte Genom verteilt sind. Über die Erkenntnisse der Microarray-Analysen hinaus konnte die kürzlich erfolgte Sequenzierung des CCCB-Genoms Aufschluss über zusätzlich ausgetauschte Bereiche und die dazugehörigen Rekombinationsstellen geben (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung).

Im Zuge dieser Arbeit sollten Gene, die durch horizontalen Gentransfer von *S. mitis* B6 auf *S. pneumoniae* R6 übertragen wurden und zur Entstehung von  $\beta$ -Lactamresistenz beitragen könnten, ausführlicher untersucht werden. Des Weiteren sollten in CCCB veränderte Gene, die als neue Resistenzdeterminanten fungieren könnten, identifiziert und analysiert werden.

#### 4.1 Der Einfluss von PBP2a aus *Streptococcus mitis* B6 auf die $\beta$ -Lactamresistenz

Rutschmann (2011) konnte zeigen, dass PBP2a aus *S. mitis* B6 in Kombination mit niedrig-affinem PBP2x klinischen Ursprungs einen Einfluss auf das Resistenzniveau hat. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Transformation des Gens *pbp2a*<sub>B6</sub> in einen Stamm, welcher zuvor durch Transformation von chromosomaler *S. mitis* B6 DNA ein nieder-affines PBP2x erhalten hatte, einen Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz zur Folge hatte (Hakenbeck *et al.*, 1998).

Das Gen *pbp2a*<sub>B6</sub> wurde im zweiten Selektionsschritt in die Transformante R6 CC<sub>T1</sub> übertragen, welche bereits ein nieder-affines PBP2x<sub>B6</sub> enthielt (Hakenbeck *et al.*, 1998). Allerdings wurden in diesen Transformationsschritten weitere Genloci durch die Verwendung von chromosomaler DNA verändert (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Der bisher weitestgehend ungeklärte Beitrag von PBP2a<sub>B6</sub> in Kombination mit PBP2x<sub>B6</sub> zur  $\beta$ -Lactamresistenz sollte in diesem Zusammenhang detailliert untersucht werden.

Um den Einfluss von *pbp2a*<sub>B6</sub> und *pbp2x*<sub>B6</sub> ohne zusätzliche genomische Veränderungen zu untersuchen wurde zunächst das PCR-Fragment von *pbp2x* aus dem Stamm R6 CC<sub>T1</sub> in den Wildtyp-Stamm *S. pneumoniae* R6 transformiert. Die Amplifikation des Gens erfolgte mit den Primern PM197 und PM80, sodass ca. 600-700 bp große flankierende Bereiche zur homologen Rekombination vorhanden waren. Die Selektion erfolgte mit einer Cefotaximkonzentration von 0,02  $\mu$ g/ml entsprechend der MHK des sensitiven Rezipienten. Dadurch sollte die Selektion zusätzlicher Mutationen möglichst vermieden werden. Der DNA-Austausch resultierte in einem PBP2x mit *S. mitis* B6 Sequenz von Aminosäure 46-176 und 281-600, wobei die C-terminalen 150 Aminosäuren, welche bei R6 CC<sub>T1</sub> ebenfalls B6 Sequenz



aufweisen, hier nicht ausgetauscht wurden. Somit besaß die Transformante R6 2x<sub>B6</sub> ein PBP2x mit der gesamten Transpeptidase-Domäne des PBP2x<sub>B6</sub> und zeigte einen Anstieg der Cefotaxim-MHK auf 0,15-0,3 µg/ml (Tabelle 4.1). Die nachfolgende Amplifikation von *pbp2a<sub>B6</sub>* mit up- und downstream-Regionen aus R6 CC<sub>T1</sub> erfolgte mit dem Primerpaar PM111-PM112. Durch die Transformation in R6 2x<sub>B6</sub> und Cefotaximselektion auf 0,5 µg/ml konnte der Stamm R6 2x<sub>B6</sub>2a<sub>B6</sub> generiert werden. Während der Donor R6 CC<sub>T1</sub> Aminosäure 1-633 von PBP2a<sub>B6</sub> enthält, wurde in dem entstandenen Derivat nur der Bereich von Aminosäure 411-633 ausgetauscht. Dies hatte jedoch einen deutlichen zehnfachen Resistenzanstieg auf 1,5-2 µg/ml für Cefotaxim zur Folge (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Cefotaxim-MHK der R6 Derivate mit PBP2x und PBP2a aus *S. mitis* B6**

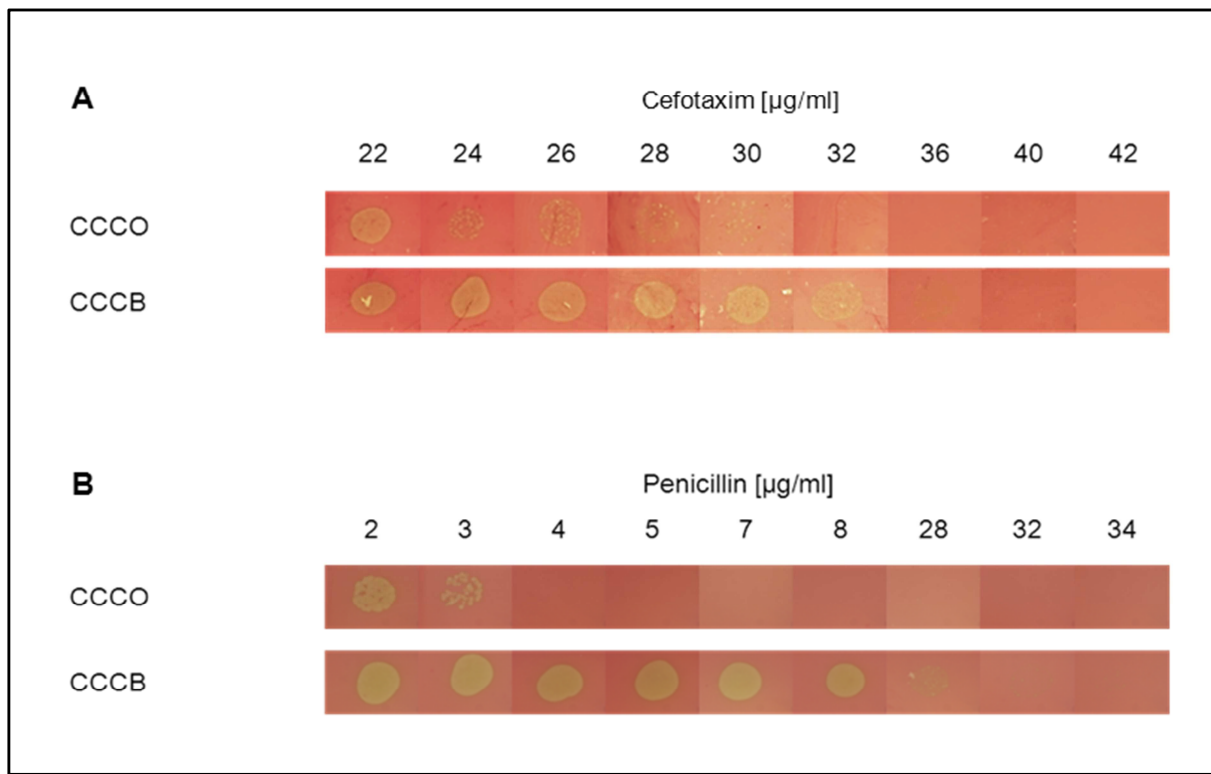
Stamm	Cefotaxim [µg/ml]
<i>S. pneumoniae</i> R6	0,02-0,03
R6 C <sub>T3</sub>	0,3-0,35
R6 CC <sub>T1</sub>	2,5-3
R6 2x <sub>B6</sub>	0,15-0,3
R6 2x <sub>B6</sub> 2a <sub>B6</sub>	1,5-2

Gezeigt sind die mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelten MHK-Werte für Cefotaxim. Die Konzentrationsspanne reichte von 0,01 µg/ml bis 3 µg/ml. Es wurden variable Abstufungen von 0,02 im unteren Konzentrationsbereich bis zu 0,5 im oberen Bereich gewählt. Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten.

## 4.2 Charakterisierung des Resistenzunterschieds zwischen CCCO und CCCB

Die PBP-Profile der Stämme CCCO und CCCB zeigen, dass beide im vierten und letzten Transformationsschritt eine niedrig-affine Variante des PBP2b aus *S. mitis* B6 erhalten haben (s. Abbildung 2.4 B). Dennoch unterscheiden sich deren Resistenzen gegen Cefotaxim und Penicillin teilweise beträchtlich, wie die MHK-Bestimmung in Abbildung 4.1 A und B zeigt. Während CCCO ab einer Cefotaximkonzentration von 30 µg/ml bereits ein deutlich beeinträchtigtes Wachstum aufweist, tritt dies bei CCCB erst ab einer Konzentration von 36 µg/ml ein. Eine noch beachtlichere Differenz zeigen die MHK-Werte gegen Penicillin. CCCO weist eine MHK von 3-4 µg/ml auf,

wohingegen CCCB erst ab einer Penicillinkonzentration von 32 µg/ml im Wachstum gehemmt wird.



**Abbildung 4.1: Cefotaxim- und Penicillinresistenz von CCCO und CCCB**

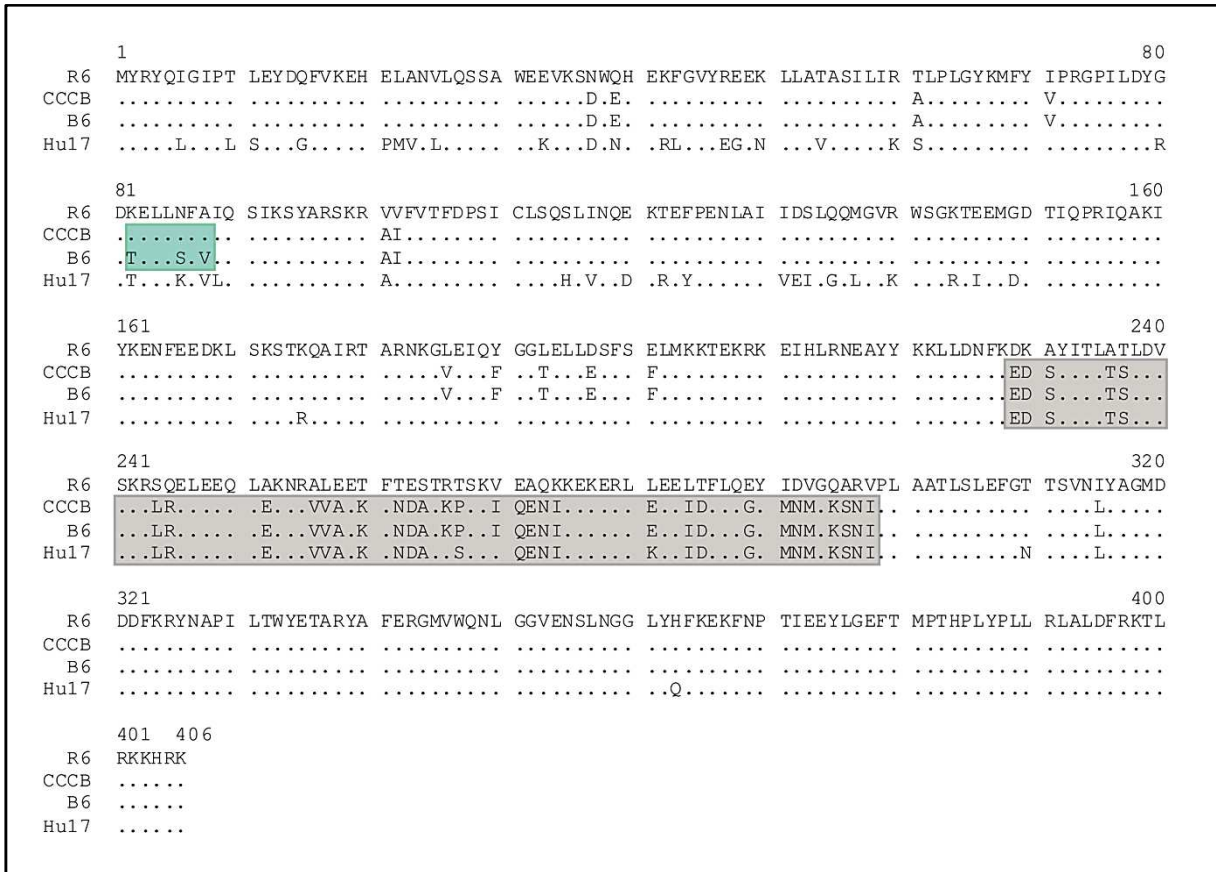
Die MHK-Werte von CCCO und CCCB wurden mithilfe der Agardilutionsmethode für Cefotaxim (A) und Penicillin (B) bestimmt. Die MHK wurde anhand des Bakterienwachstums ermittelt. Dieses wird sichtbar durch die vergrünende  $\alpha$ -Hämolyse der Bakterien auf den D-Blutagarplatten.

Zur Untersuchung genomischer Veränderungen, die für diese unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sein könnten, wurden die Genome beider Stämme mithilfe von DNA-Microarray-Analysen verglichen (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Hierbei wurden sowohl *S. pneumoniae* R6/TIGR4- als auch B6-Slides (s. Abschnitte 3.25.1.1 und 3.25.1.2) verwendet. Es konnten zwei wesentliche Unterschiede zwischen CCCB und CCCO detektiert werden. Zum einen deuteten die Microarray-Daten auf eine Veränderung des Gens *recR* hin. Es gibt bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung dieses Gens an der Resistenzentwicklung. Da *recR* upstream von *pbp2b* lokalisiert ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass bei CCCO und CCCB unterschiedlich große DNA-Fragmente von *pbp2b*<sub>B6</sub> vorhanden sind. Des Weiteren konnten die benachbarten Gene *spr0543* und *spr0544* in CCCB detektiert werden. Diese liegen in unmittelbarer Nähe zu dem Gen *murM* (*spr0540*), welches bereits mit  $\beta$ -Lactamresistenz assoziiert wurde (Filipe und Tomasz, 2000;

Weber *et al.*, 2000). Im Folgenden wurden diese potentiellen Unterschiede, welche mit den verschiedenen Resistenzphänotypen assoziiert sein könnten, detailliert untersucht.

#### 4.2.1 Phänotypische Auswirkungen verschiedener MurM Allele

Mithilfe einer Sequenzierung der Region um *murM* in CCCO und CCCB wurden zunächst die Ergebnisse der Microarray-Analysen verifiziert. Während das *murM* Gen von CCCO unverändert vorliegt, besteht das *murM* von CCCB fast komplett aus *S. mitis* B6 Sequenz. Lediglich ein kurzer Abschnitt von Basenpaar 245-273 entspricht der ursprünglichen R6 Sequenz. Dies resultiert in drei nicht veränderten Aminosäuren zwischen Aminosäure 82 und 88. Somit unterscheidet sich MurM<sub>CCCB</sub> zu 11 % von MurM<sub>R6</sub> auf Aminosäure-Ebene, während MurM aus *S. mitis* B6 einen Sequenzunterschied von 12 % aufweist. Interessanterweise existieren ähnliche Sequenzblöcke der Mosaikstruktur von MurM<sub>B6</sub> auch in dem hochresistenten *S. pneumoniae* Isolat 8249 aus Südafrika und in Vertretern des Hu<sup>19A</sup>-1 Klons (Filipe und Tomasz, 2000; Filipe *et al.*, 2000; Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Die Aminosäuresequenz von MurM aus *S. pneumoniae* Hu17, ein Vertreter des Hu<sup>19A</sup>-1 Klons, zeigt einen Unterschied von 18 % zu MurM<sub>R6</sub>. In Abbildung 4.2 ist ein Vergleich von MurM der Stämme *S. pneumoniae* R6, Hu 17, CCCB und *S. mitis* B6 gezeigt.



**Abbildung 4.2: Vergleich von MurM aus *S. pneumoniae* R6, Hu17, CCCB und *S. mitis* B6**

Der Sequenzvergleich wurde mithilfe des Programms Multalign erstellt und zeigt die Aminosäuresequenzen von MurM. Identische Aminosäuren sind als Punkte dargestellt. Die unterschiedlichen Aminosäuren zwischen MurM<sub>CCCB</sub> und MurM<sub>B6</sub> sind grün hinterlegt. Die graue Markierung zeigt einen sehr konservierten Sequenzblock in der Mosaikstruktur von MurM<sub>B6</sub> und MurM<sub>Hu17</sub>.

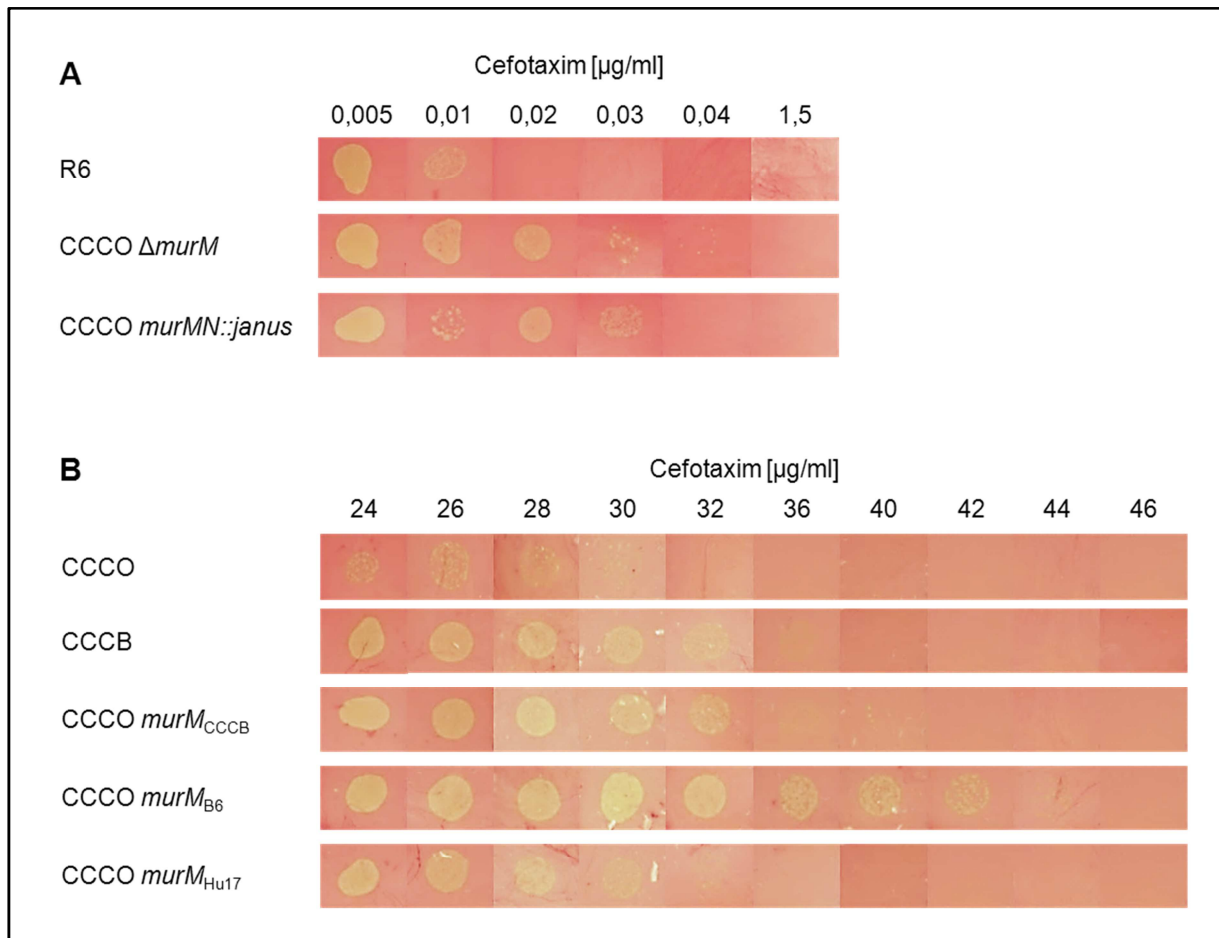
Um Aufschluss über die Ursache des Resistenzunterschieds zwischen CCCO und CCCB zu erlangen wurde der Einfluss der MurM Allele aus CCCB und B6 auf die β-Lactamresistenz untersucht. Hierzu wurden *murM*<sub>CCCB</sub> und *murM*<sub>B6</sub> anstelle des ursprünglichen *murM*<sub>R6</sub> mithilfe der Janus-Kassette (s. Abschnitt 3.26.1) in CCCO eingebracht. Zusätzlich wurde ein weiteres *murM* Allel, *murM*<sub>Hu17</sub>, mit der gleichen Klonierungsstrategie in das Genom von CCCO integriert.

Die Phänotypen der erhaltenen Stämme CCCO *murM*<sub>CCCB</sub>, CCCO *murM*<sub>B6</sub> und CCCO *murM*<sub>Hu17</sub> wurden sowohl mit dem Rezipienten CCCO als auch mit CCCB verglichen. Zudem wurde der Effekt einer Deletion von *murM* alleine sowie des Operators *murMN* auf die β-Lactamresistenz und das Wachstumsverhalten untersucht. Die *murM*-Deletion erfolgte mittels eines Minigens (CCCO Δ*murM*, s. Abbildung 3.1), welches mithilfe der Janus-Kassette wie in Abschnitt 3.26.2 beschrieben eingeführt

wurde. Im Stamm CCCO *murMN::janus* wurde das *murMN* Operon durch den Austausch gegen die Janus-Kassette deletiert (s. Abschnitt 3.26.2).

#### 4.2.1.1 Die MurM-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz

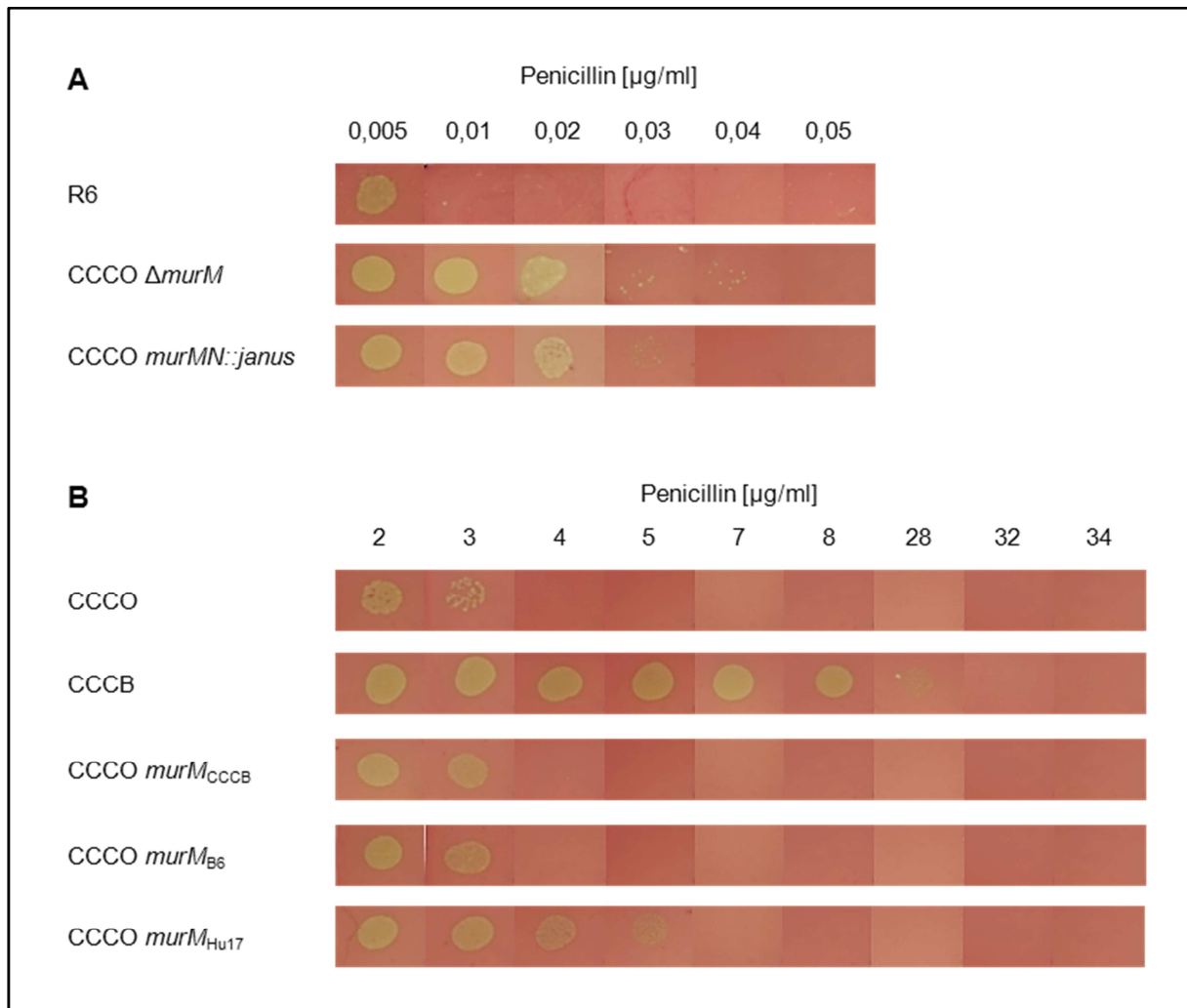
Die Deletionen sowohl von *murM* alleine als auch des kompletten Operons *murMN* resultieren in einem vollständigen Zusammenbruch des Resistenzprofils von CCCO trotz der Anwesenheit von fünf niedrig-affinen PBP (Abbildung 4.3 A und Abbildung 4.4 A). Dies bestätigt die wichtige Rolle von *murM* für die Aufrechterhaltung eines Resistenzphänotyps (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Da das alleinige Fehlen von *murM* denselben Resistenzverlust zur Folge hat wie die Doppeldeletion von *murMN*, deutet dies darauf hin, dass *murN* keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung hat. Wie Abbildung 4.3 B deutlich zeigt führen alle untersuchten *murM* Allele zu einem Resistenzanstieg gegen Cefotaxim. Das Allel aus Hu17 vermittelt hierbei den geringsten MHK Anstieg. Während CCCO für Cefotaxim eine MHK von 30  $\mu\text{g/ml}$  aufweist, zeigt der Stamm CCCO *murM*<sub>Hu17</sub> ab 32  $\mu\text{g/ml}$  Cefotaxim ein beeinträchtigt Wachstum. Die Einführung des *murM*<sub>CCCB</sub> führt zur Erhöhung der Cefotaxim-MHK auf 36  $\mu\text{g/ml}$  und entspricht damit der MHK des Donors CCCB. Der größte Resistenzanstieg wird bei CCCO *murM*<sub>B6</sub> sichtbar. Das Wachstum dieses Stammes wird erst ab einer Cefotaximkonzentration von 42  $\mu\text{g/ml}$  leicht beeinträchtigt.



**Abbildung 4.3: Cefotaximresistenz in Abhängigkeit verschiedener *murM* Allele**

Gezeigt ist die Cefotaxim-MHK der Deletionsderivate von *murM* und *murMN* in CCCO (A) sowie die Auswirkungen verschiedener *murM* Allele auf die Cefotaximresistenz von CCCO (B). Zur Bestimmung der MHK wurde die Agardilutionsmethode verwendet.

Die MHK-Werte der Stämme mit den untersuchten *murM* Allelen ergeben für Penicillin ein völlig anderes Bild (Abbildung 4.4 B). Wie zuvor bereits gezeigt weist CCCB mit 32  $\mu\text{g/ml}$  eine neunfach höhere Penicillin-MHK als CCCO auf (3-4  $\mu\text{g/ml}$ ). Bei CCCO  $\text{murM}_{\text{Hu17}}$  ist auf der Blutagarplatte mit 7  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin kein Wachstum mehr zu erkennen, dieses Allel bewirkt also eine Verdopplung des MHK-Wertes. Die *murM* Allele aus CCCB und B6 führen lediglich zu einem geringfügigen Anstieg der Resistenz. Die Stämme CCCO  $\text{murM}_{\text{CCCB}}$  und CCCO  $\text{murM}_{\text{B6}}$  wachsen bei 3  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin noch ohne jegliche Beeinträchtigung, zeigen jedoch bei 4  $\mu\text{g/ml}$  kein Wachstum mehr.



**Abbildung 4.4: Penicillinresistenz in Abhängigkeit verschiedener *murM* Allele**

Gezeigt ist die Penicillin-MHK der Deletionsderivate von *murM* und *murMN* in CCCO (A) sowie die Auswirkungen verschiedener *murM* Allele auf die Penicillinresistenz von CCCO (B). Zur Bestimmung der MHK wurde die Agardilutionsmethode verwendet.

Die Ermittlung der Piperacillinresistenz führte zu ähnlichen Ergebnissen wie für Penicillin. Die MHK von CCCB konnte mithilfe der *murM* Allele aus CCCB und B6 nicht erreicht werden (nicht gezeigt).

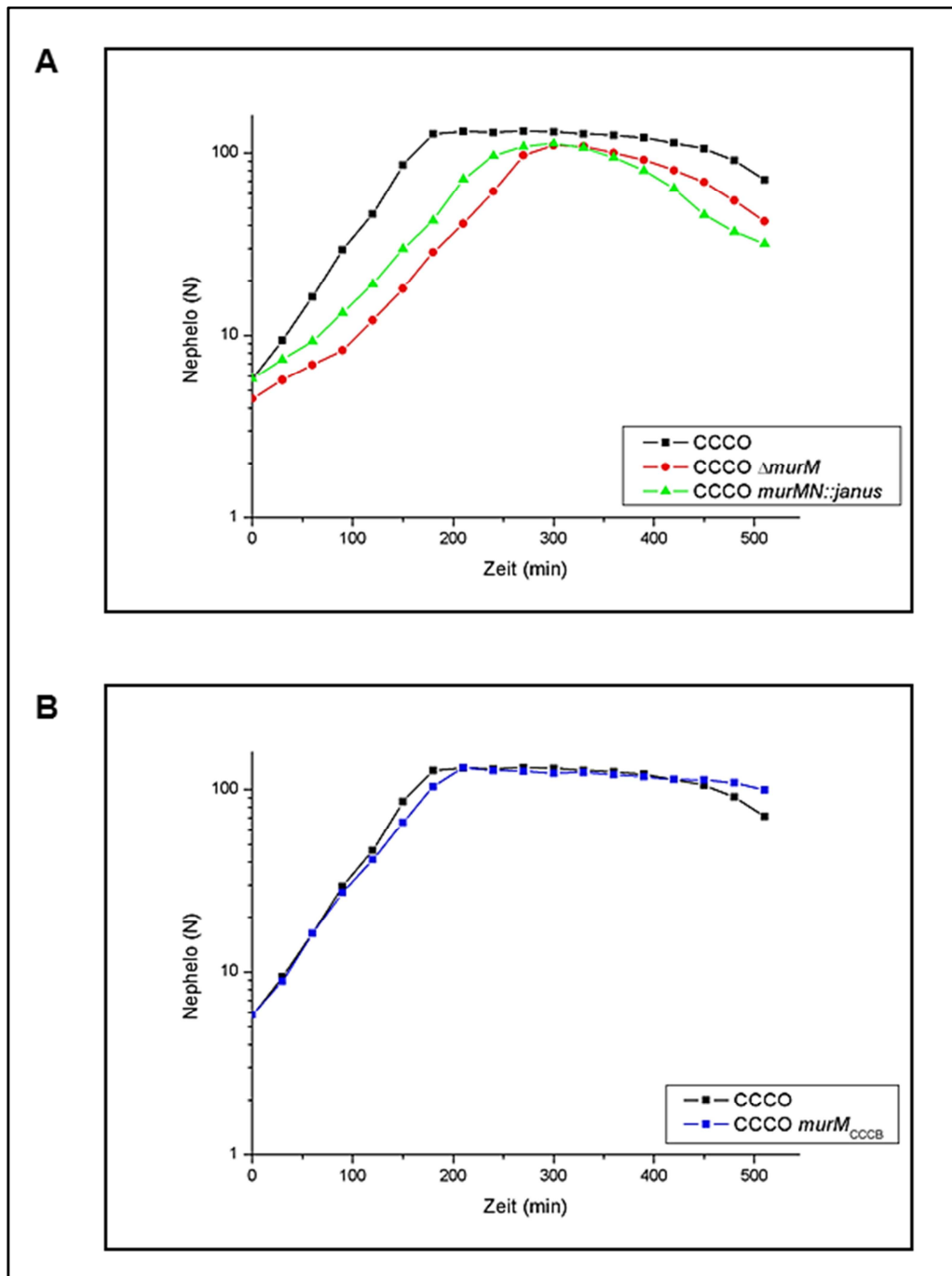
Wie die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, resultierte das CCCB *murM* Allel in einem Anstieg der Cefotaximresistenz entsprechend des Niveaus des Donors. Die Penicillin-MHK von CCCB konnte jedoch bei weitem nicht erreicht werden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass eine weitere Komponente zum Resistenzphänotyp von CCCB beiträgt.

#### 4.2.1.2 Der Einfluss von MurM auf das Wachstumsverhalten

Aufgrund vorheriger Arbeiten, die den Verlust von *murM* bzw. *murMN* bereits mit einer natürlichen oder induzierten verfrühten Lyse in der Stationärphase assoziiert haben (Filipe und Tomasz, 2000; Filipe *et al.*, 2002), wurde der Effekt verschiedener *murM* Allele sowie der Deletionen auf das Wachstumsverhalten untersucht.

Wie anhand von Abbildung 4.5 A und B zu sehen ist, führen die Deletionen von *murM* und *murMN* zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums. Die Stämme CCCO  $\Delta murM$  und CCCO *murMN::janus* zeigen mit Generationszeiten von 52 bzw. 51 min ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Vorgängerstamm CCCO mit 37 min (Tabelle 4.2). Zudem zeigen die Wachstumskurven dieser beiden Stämme nur eine kurze Stationärphase aufgrund einer verfrühten Autolyse. Dagegen haben die drei *murM* Allele keinen Effekt auf Wachstum und Lyse. Die Generationszeiten und der Wachstumsverlauf sind nahezu identisch. Beispielhaft ist in Abbildung 4.5 B die Wachstumskurve von CCCO *murM*<sub>CCCB</sub> dargestellt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, führt *murM*<sub>CCCB</sub> zu keinem ersichtlichen Unterschied im Wachstumsverhalten verglichen mit dem Rezipienten. Auch die Generationszeit dieses Stammes entspricht mit 42 min in etwa der von CCCO (Tabelle 4.2). Morphologisch wurden keine Veränderungen sowohl der Zellen mit den unterschiedlichen *murM* Allelen als auch der Deletionsderivate festgestellt (nicht gezeigt).





**Abbildung 4.5: Wachstumsverhalten von CCCO mit  $murM_{CCCB}$  sowie den  $murMN$  Deletionsderivaten**

In Teil A sind die Stämme CCCO, CCCO  $\Delta murM$  und CCCO  $murMN::janus$  dargestellt. Teil B zeigt CCCO im Vergleich mit CCCO  $murM_{CCCB}$ . Das Wachstum in C-Medium wurde mithilfe eines Nephelometers alle 30 min ermittelt.

**Tabelle 4.2: Generationszeiten von CCCO mit *murM*<sub>CCCB</sub> und den *murM* Deletionsderivaten**

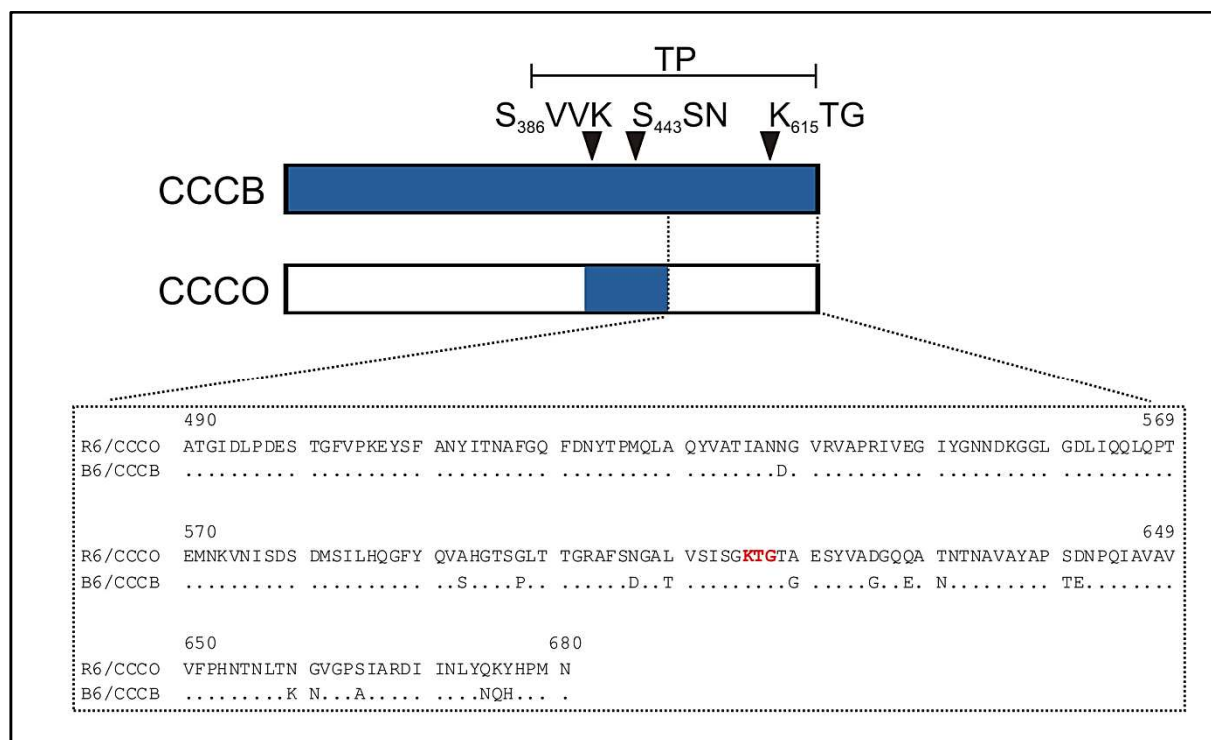
Stamm	Generationszeit <sup>1</sup> (min)
CCCO	37
CCCO <i>murM</i> <sub>CCCB</sub>	42
CCCO $\Delta$ <i>murM</i>	52
CCCO <i>murMN::janus</i>	51

1 = Die Generationszeit wurde anhand der Wachstumskurve in Abbildung 4.5 rechnerisch ermittelt.

#### 4.2.2 Der Beitrag von PBP2b zur Penicillinresistenz von CCCB

Die bisherigen Versuche zur Charakterisierung des Resistenzunterschieds zwischen CCCO und CCCB zeigten eindeutig, dass das Allel *murM*<sub>CCCB</sub> für die höhere Cefotaximresistenz von CCCB verantwortlich ist. Dieses Allel hatte jedoch nur einen minimalen Anstieg der Penicillin-MHK des Stammes CCCO *murM*<sub>CCCB</sub> zur Folge. Die hohe Penicillinresistenz von CCCB konnte bei weitem nicht erreicht werden.

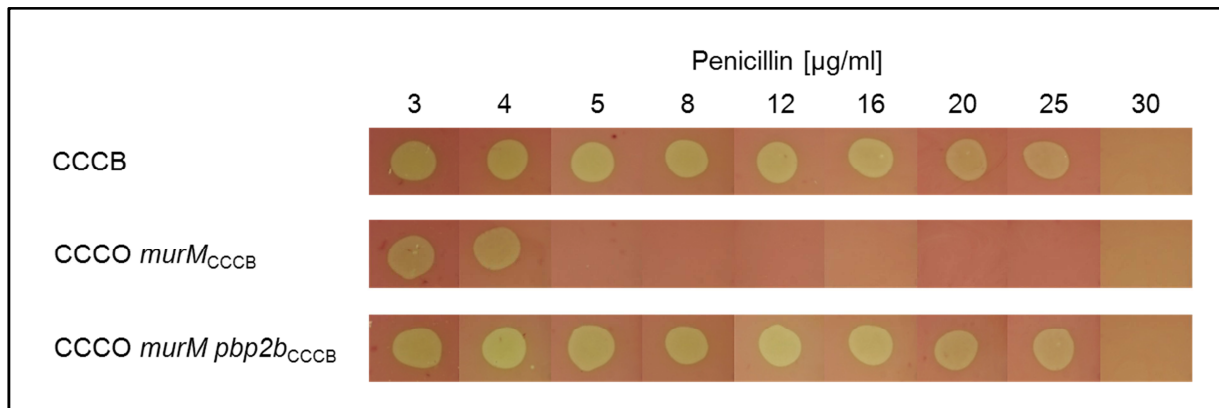
Einen Anhaltspunkt auf einen weiteren Unterschied, der mit dem Resistenzphänotyp von CCCB assoziiert sein könnte, zeigte sich anhand des veränderten *recR* in den Microarray-Daten (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Aufgrund der benachbarten Lokalisation zu *pbp2b* wurden die genomischen Veränderungen dieser Region in CCCO und CCCB überprüft. Die Sequenzierung zeigte einen deutlichen Unterschied in der Größe der integrierten *S. mitis* B6 DNA-Fragmente. Während CCCB das komplette *pbp2b*<sub>B6</sub> aufweist, liegt bei CCCO lediglich ein kleiner Bereich von Basenpaar 1147-1473 verändert vor. Dies führt zu einem PBP2b mit B6 Sequenz von Aminosäure 383-489. Dieser kleine Bereich der Transpeptidase Domäne, welcher zwei der drei konservierten Motive beinhaltet, scheint ausreichend für eine niedrig-affine Variante von PBP2b zu sein, welche mittels fluoreszierendem Bocillin nicht detektiert werden kann (s. Abschnitt 3.21). Anhand des PBP-Profiles konnte bisher kein Unterschied zwischen CCCO und CCCB identifiziert werden (s. Abbildung 2.4 B). Abbildung 4.6 zeigt zum einen eine schematische Darstellung von PBP2b aus CCCO und CCCB sowie einen Sequenzvergleich des C-Terminus.



**Abbildung 4.6: Schematische Darstellung von PBP2b aus CCCO und CCCB**

Die *S. mitis* B6 Sequenz ist in blau abgebildet, die *S. pneumoniae* R6 Sequenz in weiß. Die Transpeptidase-Domäne (TP) beinhaltet die drei konservierten Boxen (schwarze Dreiecke). Das Alignment der Aminosäuresequenzen zeigt den C-terminalen Bereich der Transpeptidase-Domäne. Identische Aminosäuren sind als Punkte dargestellt, das KTG-Motiv ist in rot gezeigt.

Im Folgenden wurde der Beitrag von PBP2b<sub>B6</sub> zur Resistenz von CCCB untersucht. Um Aufschluss darüber zu erlangen ob *pbp2b*<sub>B6</sub> in Kombination mit einem bereits veränderten *murM* zur Penicillinresistenz von CCCB beiträgt, wurden beide Gene im genetischen Hintergrund von CCCO untersucht. Der zuvor beschriebene Stamm CCCO *murM*<sub>CCCB</sub> (s. Abschnitt 4.2.1) diente als Rezipient für die Transformation von *pbp2b* aus CCCB. Die Amplifikation von *pbp2b* mit up- und downstream-Regionen erfolgte mit dem Primerpaar PM98-PM114. Durch die Transformation in CCCO *murM*<sub>CCCB</sub> und Penicillinselektion auf 8 µg/ml konnte der Stamm CCCO *murM pbp2b*<sub>CCCB</sub> mit einer hohen Transformationseffizienz von 0,4 % generiert werden. Die Untersuchung der Penicillinresistenz dieses Stammes ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Die zusätzlichen *pbp2b*-Sequenzen aus CCCB führten zu einem Anstieg der Resistenz auf 30 µg/ml entsprechend der MHK des Donors. Diese Daten zeigen, dass Veränderungen außerhalb des in PBP2b<sub>CCCO</sub> ausgetauschten Sequenzblocks (AS 383-489) die höhere Penicillinresistenz von CCCB bewirken.



**Abbildung 4.7: Penicillinresistenz in Abhängigkeit von *murM* und *pbp2b***

Gezeigt ist der Beitrag von *murM* und *pbp2b* aus CCCB zur Penicillin-MHK von CCCO. Zur Bestimmung der MHK wurde die Agardilutionsmethode verwendet.

Die Piperacillinresistenz von CCCO *murM pbp2b*<sub>CCCB</sub> entspricht ebenfalls der von CCCB (nicht gezeigt). Wie zu erwarten führt *pbp2b*<sub>CCCB</sub> zu keiner Änderung der Cefotaximresistenz (nicht gezeigt), da dieses Cephalosporin der dritten Generation nicht mit PBP2b interagiert (Hakenbeck *et al.*, 1987).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Veränderungen in *murM*<sub>CCCB</sub> und *pbp2b*<sub>B6</sub> für den Unterschied der Resistenzphänotypen von CCCO und CCCB verantwortlich sind.

### 4.3 Identifizierung weiterer Resistenzdeterminanten

Wie die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, wurde neben den PBP auch MurM aus *S. mitis* B6 als Resistenzdeterminante in CCCB identifiziert. Obwohl CCCB bereits eine sehr hohe  $\beta$ -Lactamresistenz aufweist, konnte das publizierte Resistenzniveau von *S. mitis* B6 für Oxacillin, Penicillin und Piperacillin nicht vollständig erreicht werden (Hakenbeck *et al.*, 1998). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob weitere Resistenzdeterminanten von *S. mitis* B6 auf CCCB übertragen und so identifiziert werden können.

### 4.3.1 Isolierung von CCCB-Derivaten mit erhöhter Resistenz

Durch die Transformation von CCCB mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA und Selektion auf  $\beta$ -Lactamantibiotika sollten weitere Resistenzdeterminanten übertragen und identifiziert werden. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Oxacillin (O) oder Penicillin (B = Benzylpenicillin), wobei sich die Benennung der neuen CCCB-Derivate an den Anfangsbuchstaben des jeweiligen Antibiotikums orientierte. Zur Penicillinselektion wurden die Konzentrationen 45, 50 und 55  $\mu\text{g/ml}$  gewählt. Für Oxacillin wurden die Konzentrationen 90, 100 und 120  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. In Tabelle 4.3 sind die Selektionsbedingungen und die bei der Transformation der vier gezeigten Stämme ermittelten Transformationseffizienzen dargestellt. Aufgrund des schlechten Verhältnisses der Koloniezahl des Transformationsansatzes mit Antibiotikum zur Kontrolle ohne Antibiotikum bei 90  $\mu\text{g/ml}$  Oxacillin und 45  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin wurden diese Transformationen nicht berücksichtigt.

**Tabelle 4.3: Selektion und Transformationseffizienz der CCCB-Transformanten**

Stamm	Antibiotika	Selektionskonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Transformationseffizienz (%)
CCCB B2	Penicillin	50	$3,1 \cdot 10^{-4}$
CCCB B6	Penicillin	55	$0,8 \cdot 10^{-4}$
CCCB O3	Oxacillin	100	$0,8 \cdot 10^{-4}$
CCCB O6	Oxacillin	120	$0,03 \cdot 10^{-4}$

Die sehr geringen Transformationseffizienzen deuten auf Schwierigkeiten während der Selektion von Resistenzdeterminanten hin. Vor diesem Hintergrund wurden die publizierten Resistenzprofile von CCCB und *S. mitis* B6, auf die bisher Bezug genommen wurde, zunächst mithilfe der Agardilutionsmethode neu ermittelt (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4: Vergleich der Resistenzprofile von CCCB und *S. mitis* B6**

Stamm	Cefotaxim	Oxacillin	Penicillin	Piperacillin
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]			
CCCB	36-40	70	32-34	15-20
<i>S. mitis</i> B6	20	70-80	25-30	30

Gezeigt sind die mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelten MHK-Werte von CCCB und *S. mitis* B6 für vier  $\beta$ -Lactamantibiotika. Auswertung von zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

Die ermittelten MHK-Werte von *S. mitis* B6 weichen deutlich von den publizierten Daten ab (Hakenbeck *et al.*, 1998). Zudem ist *S. mitis* B6 gegenüber Cefotaxim und Penicillin sogar sensitiver als CCCB. Die publizierten MHK-Werte konnten demnach mit der gleichen Versuchsdurchführung unter den jetzigen Bedingungen nicht reproduziert werden.

Anhand dieses durchgeführten MHK-Vergleichs lässt sich die schlechte Transformationseffizienz erklären.

Ungeachtet der demnach nur leicht höheren Oxacillin-MHK von *S. mitis* B6 und sogar einer geringeren Penicillin-MHK im Vergleich zu CCCB konnten resistenterere CCCB-Derivate mit Selektion dieser  $\beta$ -Lactame erhalten werden (s. Tabelle 4.3). Die Stämme CCCB B2 und CCCB O6 zeigten den größten Resistenzanstieg (Tabelle 4.5) und wurden im Folgenden mithilfe eines genomischen Vergleichs detailliert analysiert.

**Tabelle 4.5: Resistenzprofile der CCCB-Derivate B2 und O6**

Stamm	Cefotaxim	Oxacillin	Penicillin	Piperacillin
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]			
CCCB	36-40	70	32-34	15-20
CCCB B2	80	<u>140</u> -150	70	60
CCCB O6	60-70	<u>120</u> -130	60	<u>40</u> -60

Gezeigt sind die mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelten MHK-Werte von CCCB im Vergleich zu CCCB B2 und CCCB O6 für vier  $\beta$ -Lactamantibiotika. Bei größeren Abweichungen dieser zwei bis vier unabhängigen Experimente ist die Tendenz unterstrichen.

#### 4.3.1.1 Genomische Veränderungen von CCCB B2

Ein genomischer Vergleich von CCCB und CCCB B2 wurde mithilfe von DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden sowohl R6/TIGR4- als auch B6-Slides verwendet (s. Abschnitt 3.25.1.1 und 3.25.1.2). Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tabelle 4.6 gezeigt. Als Schwellenwerte für signifikant veränderte Gene wurden die Mittelwerte der normalisierten Intensitätsverhältnisse gewählt, die kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 waren (s. Abschnitt 3.25.5.2). Der P-Wert, welcher die Irrtumswahrscheinlichkeit eines Stichprobenergebnisses anzeigt, sollte kleiner oder gleich 0,03 sein. Intensitätsverhältnisse mit Mittelwerten kleiner 1 zeigen, dass mehr CCCB DNA gebunden hat, wohingegen Mittelwerte größer 1

darauf hindeuten, dass hier mehr DNA des zu testenden Stammes CCCB B2 gebunden hat. Demzufolge liegt das entsprechende Gen möglicherweise in diesem Stamm verändert vor oder wurde gegen das *S. mitis* B6-Homolog ausgetauscht.

**Tabelle 4.6: DNA-Microarray-Analyse von CCCB und CCCB B2**

Gen	Mittelwert	Produkt	Homolog in R6/B6
<b>R6-Slide</b>			
spr0683	0,12	konserviertes hypothetisches Protein	smi_0826
<b>B6-Slide</b>			
smi_0826	0,09	konserviertes hypothetisches Protein	spr0683

Genomischer Vergleich von CCCB und CCCB B2 mithilfe einer DNA-Microarray-Analyse auf je einem R6/TIGR4- bzw. B6-Slide. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und einem P-Wert kleiner oder gleich 0,03.

Das Gen spr0683 bzw. sein B6-Homolog smi\_0826 deuteten auf Veränderungen in CCCB B2 hin. Allerdings zeigen die Mittelwerte, dass auf beiden Slides mehr der CCCB DNA gebunden hat, d.h. die DNA der Transformante CCCB B2 hat nicht oder nur in geringem Maße an das R6- bzw. B6-Oligonukleotid gebunden. Eine Sequenzierung dieses Gens in CCCB B2 zeigte, dass hier statt eines Austauschs gegen *S. mitis* B6 DNA das Gen spr0683 ab Basenpaar 25 deletiert vorliegt. Aufgrund der Positionen des R6- und B6-Oligonukleotids zwischen Basenpaar 94 und 195 ist das verkürzte Gen anhand der Microarray-Analyse nicht detektierbar. Es handelt sich bei CCCB B2 folglich um eine Mutante, die mit einem Transformationsereignis nicht in Verbindung gebracht werden kann. Durch das Fehlen der 146 Basen des nur 240 bp großen Gens wird lediglich ein verkürztes Protein translatiert, das vermutlich inaktiv ist. Spr0683 kodiert für ein hypothetisches Protein mit KH-Domäne, welche im Zuge der Deletion in CCCB B2 verloren geht. Diese „K homology“ (KH-) Domäne ist nach dem humanen Ribonukleoprotein K benannt (hnRNP K), in welchem sie zuerst identifiziert wurde (Siomi *et al.*, 1993). Die KH-Domäne besitzt ein konserviertes Motiv, das aus Glycin, zwei variablen Aminosäuren und einem zweiten Glycin besteht (GxxG) und findet sich häufig in Proteinen, welche RNA- bzw. einzelsträngige Nukleinsäuren binden können.

Da die DNA-Microarray-Analyse nicht das komplette Genom abdeckt und mögliche Punktmutationen mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden können, kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Veränderungen in CCCB B2 vorhanden und somit für den Resistenzanstieg gegenüber CCCB verantwortlich sein könnten.

Aus diesem Grund wurde das Gen spr0683 gezielt mithilfe der Spectinomycin Resistenzkassette *aad9* deletiert (s. Abschnitt 3.26.3) und der Effekt auf die Resistenz analysiert (s. Abschnitt 4.3.2).

#### 4.3.1.2 Genomische Veränderungen von CCCB O6

Der Stamm CCCB O6 wurde ebenfalls mittels DNA-Microarray im Hinblick auf genomische Veränderungen im Vergleich zu CCCB untersucht. Tabelle 4.7 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierungen auf einem R6/TIGR4- und B6-Slide. Die gewählten Schwellenwerte und der P-Wert entsprechen den Microarray-Analysen von CCCB B2.

**Tabelle 4.7: DNA-Microarray-Analyse von CCCB und CCCB O6**

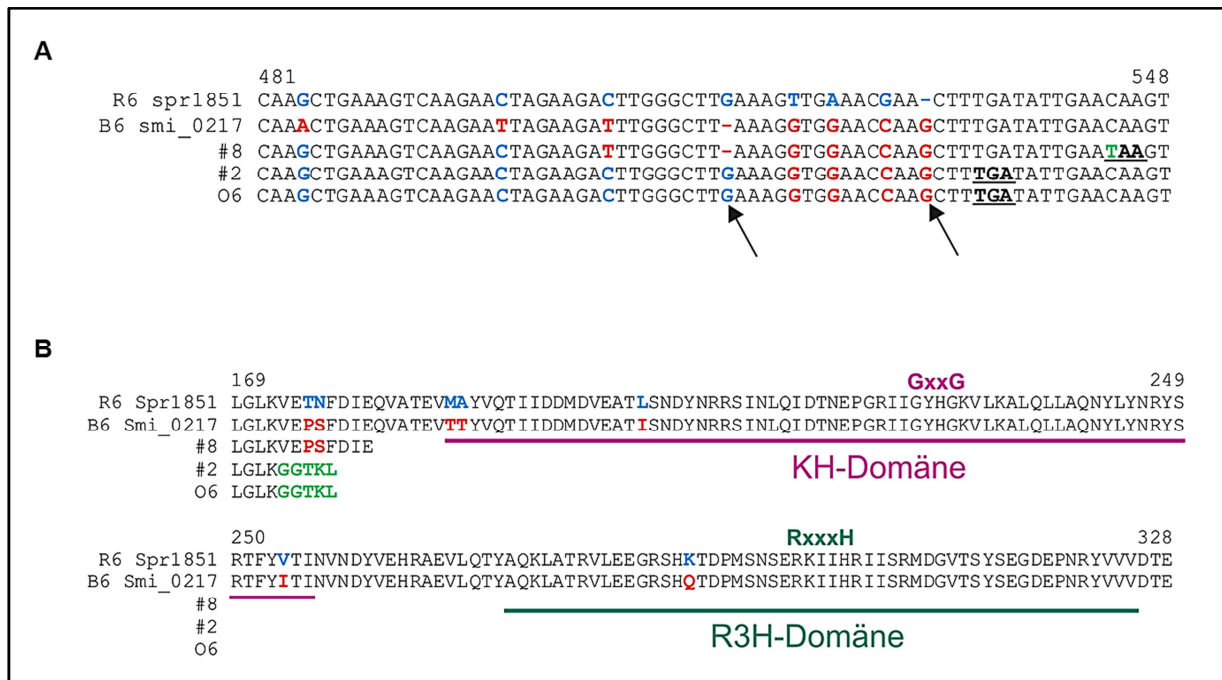
Gen	Mittelwert	Produkt	Homolog in R6/B6
<b>R6-Slide</b>			
spr1850	0,12	hypothetisches Protein	smi_0218
spr1851	0,18	hypothetisches Protein	smi_0217
<b>B6-Slide</b>			
smi_2001-smi_2002	4,02	intergener Bereich	

Genomischer Vergleich von CCCB und CCCB O6 mithilfe einer DNA-Microarray-Analyse auf je einem R6/TIGR4- bzw. B6-Slide. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und einem P-Wert kleiner oder gleich 0,03.

Die Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse zeigen, dass mehr CCCB DNA an die Oligonukleotide der aufeinanderfolgenden Gene spr1850 und spr1851 gebunden hat. Dies deutet auf einen Austausch dieses Bereichs gegen *S. mitis* B6 DNA in CCCB O6 hin. Die Betrachtung der Microarray-Daten bei geringerer Stringenz (Schwellenwerte kleiner oder gleich 0,5 bzw. größer oder gleich 2) lieferte zudem ein signifikantes Hybridisierungssignal für das B6-Homolog von spr1850, smi\_0218, auf dem B6-Slide und deutete somit ebenfalls auf einen Austausch in CCCB O6 hin (nicht gezeigt). Die vermutlich ausgetauschten Gene smi\_0217 und smi\_0218 wurden hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit dem Resistenzanstieg von CCCB O6 isoliert untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Fragment, welches beide Gene sowie die flankierenden Regionen zur homologen Rekombination überdeckt, mit den Primern J29 und J30 aus *S. mitis* B6 amplifiziert und in CCCB transformiert.



Nach erfolgter Oxacillinselektion wurden die zwei Transformanten CCCB smi0217/0218 #2 und #8 näher untersucht. Die Überprüfung der Sequenz von spr1850/1851 in CCCB O6 sowie den Transformanten #2 und #8 lieferte ein überraschendes Ergebnis. Zwar wurde das Gen spr1851 in allen drei Stämmen teilweise gegen *S. mitis* B6 DNA ausgetauscht, jedoch kommt es kurz nach der Rekombinationsstelle zu Veränderungen, die einen Abbruch der Proteinsynthese bewirken. Während dies in CCCB smi0217/0218 #8 durch eine Punktmutation (C544T) und einem daraus resultierenden Stoppcodon ausgelöst wird, ist in CCCB O6 und dem Stamm CCCB smi0217/0218 #2 die Anwesenheit einer zusätzlichen Base für den Translationsabbruch verantwortlich. Aufgrund der Position des ersten ausgetauschten Nukleotids befindet sich eine Base mehr im Gen (Abbildung 4.8 A). Infolgedessen kommt es zu einem Frameshift, welcher ebenfalls ein Stoppcodon in unmittelbarer Nähe des Rekombinationsereignisses zur Folge hat. Abbildung 4.8 zeigt den Bereich der ausgetauschten DNA-Sequenzen in spr1851 mit den entsprechenden Veränderungen sowie die daraus resultierenden verkürzten Proteine. Das Gen spr1851 kodiert für ein hypothetisches Protein, welches zusätzlich zu der in Abschnitt 4.3.1.1 bereits erwähnten KH-Domäne von Spr0683 noch eine R3H-Domäne enthält. Diese Domäne zeichnet sich durch ein konserviertes Arginin und Histidin aus, welche durch drei variable Aminosäuren voneinander getrennt vorliegen. Die R3H-Domäne findet sich wie auch die KH-Domäne in Proteinen, welche RNA- bzw. einzelsträngige Nukleinsäuren binden können (Grishin, 1998; Siomi *et al.*, 1993). Wie Abbildung 4.8 B zeigt, endet das mögliche Protein in allen drei Stämmen direkt vor den beiden Domänen.



**Abbildung 4.8: Rekombinationsereignisse in spr1851**

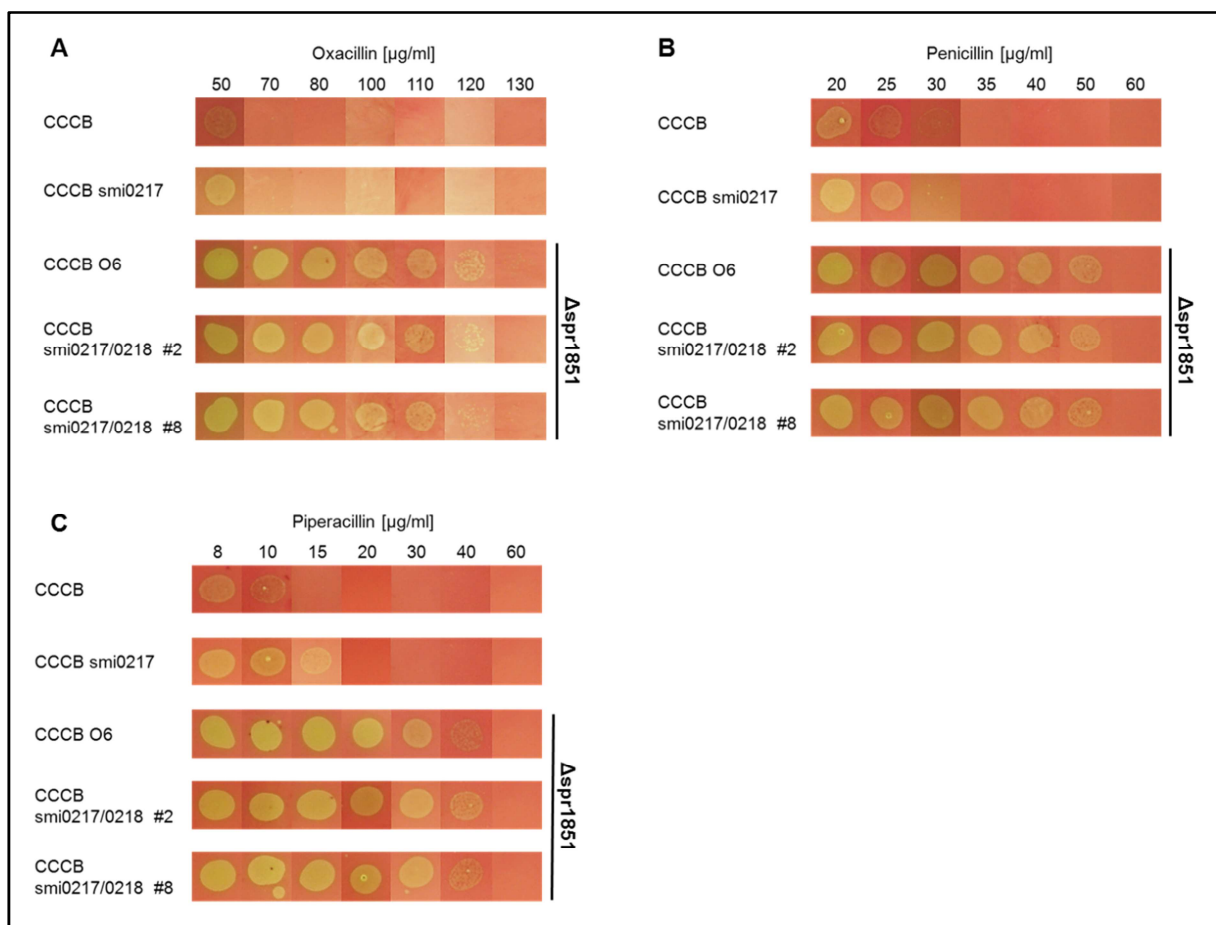
Die Rekombinationsereignisse in den Stämmen CCCB smi0217/0218 #2, #8 und O6 (A) zeigen den Austausch von spr1851 (R6-Sequenz, blau) gegen smi\_0217 (B6-Sequenz, rot). Die Punktmutation (C544T) der Transformante #8 ist in grün abgebildet. Die resultierenden Stoppcodons sind fett gedruckt und unterstrichen. Die schwarzen Pfeile weisen auf die Positionen hin, welche aufgrund der Rekombinationsstelle für die zusätzliche Base in #2 und O6 verantwortlich sind. (B) Mögliche Translationsprodukte von spr1851-Varianten. Blau: R6-Sequenz; rot: B6-Sequenz. Grün: veränderte Aminosäuresequenz in #2 und O6. Die KH- (lila unterstrichen) und R3H-Domänen (grün unterstrichen) sind mit ihren konservierten Motiven abgebildet.

Das Gen spr1850 wurde in den Stämmen CCCB smi0217/0218 #2 und O6 vollständig gegen das homologe *S. mitis* B6 smi\_0218 ausgetauscht, wohingegen der Stamm CCCB smi0217/0218 #8 nur einen Austausch von Basenpaar 1-345 zeigte. Dieser Austausch wurde zunächst nicht weiter untersucht.

Aufgrund der auffälligen Rekombinationsereignisse, welche zu einer Deletion von spr1851 in den Stämmen CCCB O6, CCCB smi0217/0218 #2 und #8 führten, wurde zunächst der Zusammenhang mit der  $\beta$ -Lactamresistenz untersucht. Wie schon im Falle von CCCB B2 kann man hier eher von Mutanten als von Transformanten sprechen. Interessanterweise erfolgte die Deletion auf zwei unterschiedlichen Wegen bei Transformanten, welche zudem auf unterschiedliche Weise hergestellt wurden (Transformation mit chromosomaler DNA oder PCR-Produkt). Neben der Deletion von spr1851 wurde der Einfluss des homologen smi\_0217 aus *S. mitis* B6

untersucht. Dieses Gen wurde wie in Abschnitt 3.26.5 beschrieben mithilfe der Januskassette in CCCB eingebracht.

Wie Abbildung 4.9 zeigt, weisen die Stämme CCCB smi0217/0218 #2 und #8 für die drei getesteten  $\beta$ -Lactamantibiotika ein sehr ähnliches Resistenzniveau wie CCCB O6 auf. Die MHK-Werte dieser drei Stämme sind mit 120  $\mu\text{g/ml}$  für Oxacillin sowie 60  $\mu\text{g/ml}$  für Penicillin und Piperacillin deutlich höher als die MHK von CCCB. Der Austausch von spr1851 gegen das B6-Homolog smi\_0217 in CCCB zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Resistenz dieses Stammes. Die MHK-Werte von CCCB smi0217 entsprechen denen von CCCB.



**Abbildung 4.9: Resistenzprofile der CCCB-Derivate mit smi0217 und diversen spr1851-Deletionen**

Die Abbildung zeigt die Resistenzprofile der CCCB-Derivate für Oxacillin (A), Penicillin (B) und Piperacillin (C). Die MHK wurde mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelt.

Wie anhand von Abbildung 4.9 deutlich gezeigt wurde, weisen die Stämme mit fehlendem spr1851 eine höhere Resistenz auf. Jedoch kann aufgrund der Transformation mit chromosomaler DNA bzw. einem PCR-Produkt eines größeren Sequenzabschnitts nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Veränderungen zu dem

ermittelten Resistenzanstieg geführt haben. Zur Untersuchung eines möglichen Effektes durch das alleinige Fehlen von spr1851 wurde eine gezielte Deletion dieses Gens hergestellt und im Folgenden phänotypisch charakterisiert.

#### **4.3.2 Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 – phänotypische Auswirkungen**

Die bisherigen Untersuchungen der Stämme CCCB B2 und CCCB O6 deuten darauf hin, dass der Verlust der Gene spr0683 und spr1851 einen Einfluss auf die  $\beta$ -Lactamresistenz hat (s. Abschnitt 4.3.1.1 und 4.3.1.2). Im Folgenden werden die Auswirkungen der Deletionen von spr0683 und spr1851 isoliert, d.h. ohne weitere genomische Veränderungen, detailliert analysiert. Zur phänotypischen Untersuchung wurden beide Gene sowohl in CCCB (in Anwesenheit anderer Resistenzdeterminanten) als auch in R6 (ohne den Einfluss anderer Resistenzdeterminanten) deletiert. Für die Herstellung der Stämme R6  $\Delta$ spr0683 und CCCB  $\Delta$ spr0683 diente die Spectinomycin Resistenzkassette (s. Abschnitt 3.26.3). Zur Deletion des Gens spr1851 in R6 und CCCB wurde dieses zunächst durch die Januskassette ersetzt (s. Abschnitt 3.26.4). Transkriptionsanalysen (s. Abschnitt 4.3.2.3) des Stammes R6 spr1851::*janus* zeigten allerdings, dass das downstream gelegene Gen spr1850 durch den sehr effizienten Promotor der Januskassette auffällig stark exprimiert wurde. Zur Vermeidung dieses Effektes wurde anstelle der Januskassette ein spr1851-Minigen integriert (s. Abschnitt 3.26.4). Die so erhaltenen Deletionsderivate R6  $\Delta$ spr1851 und CCCB  $\Delta$ spr1851 wurden für die folgende phänotypische Charakterisierung verwendet.

Da es sich bei beiden Genprodukten von spr0683 und spr1851 um hypothetische, Nukleinsäure-bindende Proteine mit KH-Domäne handelt, ist eine Kompensation der Deletion eines der beiden Gene durch die Anwesenheit des anderen nicht auszuschließen. Zur Überprüfung eines möglichen kompensatorischen Effekts wurden beide Gene zusammen sowohl in R6 als auch in CCCB deletiert.

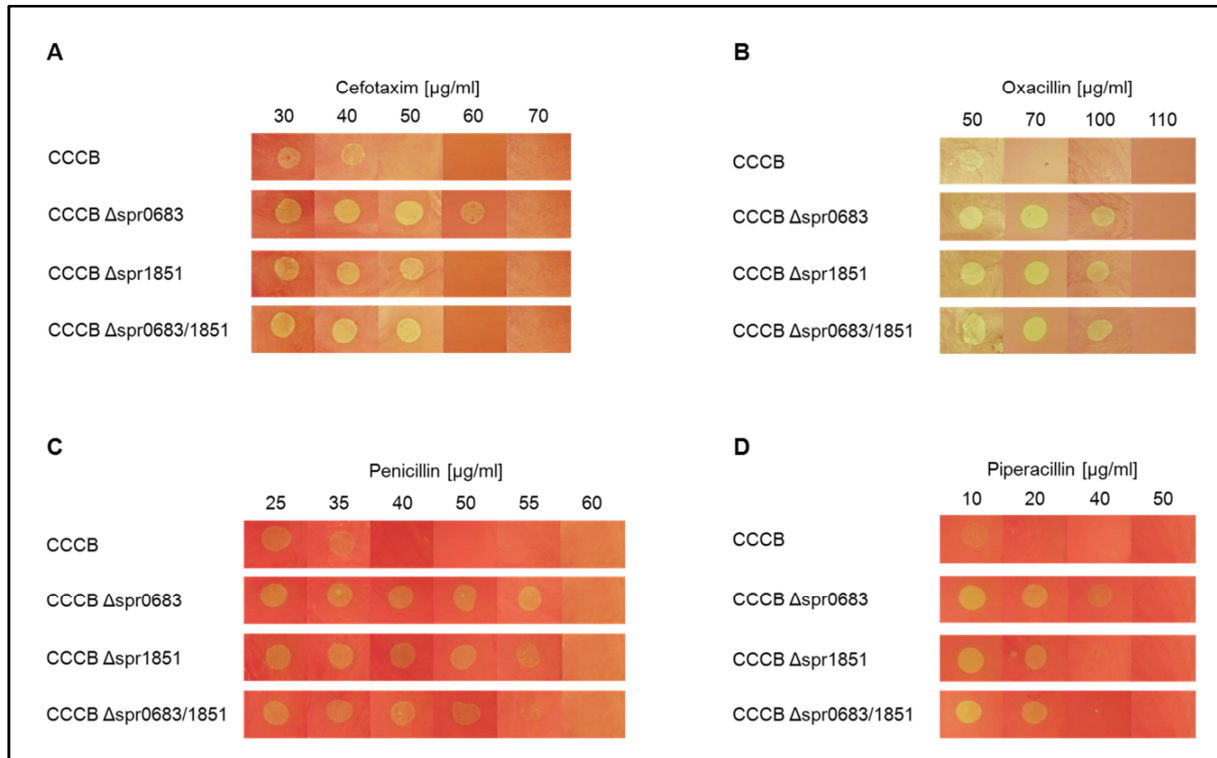
#### 4.3.2.1 Deletionen von spr0683 und spr1851 – Auswirkungen auf die $\beta$ -Lactamresistenz

Um die Auswirkungen des Fehlens der Gene spr0683 und spr1851 auf die  $\beta$ -Lactamresistenz zu untersuchen wurde eine MHK-Bestimmung mithilfe der Agardilutionsmethode durchgeführt. Zunächst wurden die Deletionsderivate CCCB  $\Delta$ spr0683, CCCB  $\Delta$ spr1851 und CCCB  $\Delta$ spr0683/1851 mit dem Rezipienten CCCB hinsichtlich ihrer  $\beta$ -Lactamresistenz verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Einzel- und Doppeldelationen auf die MHK des sensitiven Stammes *S. pneumoniae* R6 für vier  $\beta$ -Lactame untersucht. Zur Bestimmung von Kreuzresistenzen zwischen verschiedenen  $\beta$ -Lactamen wurden Cefotaxim, Oxacillin, Penicillin und Piperacillin ausgewählt.

Wie Abbildung 4.10 deutlich zeigt, führen sowohl die Einzeldelationen von spr0683 und spr1851 als auch eine Doppeldelation zu einem Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz in CCCB. Tabelle 4.8 gibt zudem die Erhöhung der  $\beta$ -Lactamresistenz im Vergleich zu CCCB bzw. R6 wider. Die hohe Resistenz der Stämme CCCB B2 und CCCB O6 (s. Tabelle 4.5) gegen Cefotaxim, Penicillin und Piperacillin kann durch das alleinige Fehlen von spr0683 und spr1851 annähernd erreicht werden. Die Deletion von spr0683 vermittelt dabei einen höheren Resistenzanstieg gegen Cefotaxim als das Fehlen von spr1851 oder die Doppeldelation (Abbildung 4.10 A). Wie Abbildung 4.10 B zeigt sind alle Deletionsderivate mit einer Oxacillin-MHK von 110  $\mu$ g/ml resistenter als CCCB, allerdings ist die Resistenz deutlich niedriger als die der Stämme CCCB B2 und CCCB O6. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass andere genomische Veränderungen oder Punktmutationen einen Beitrag zu der hohen Resistenz gegen Oxacillin leisten. Alle Deletionskonstrukte vermitteln einen 1,5-fachen Resistenzanstieg gegen Penicillin (Abbildung 4.10 C). Die Deletionsderivate weisen den größten Resistenzanstieg gegen Piperacillin auf (Abbildung 4.10 D), wobei das Fehlen von spr0683 die höchste Resistenz vermittelt.

Die MHK von CCCB  $\Delta$ spr0683/1851 entspricht für Oxacillin und Penicillin den Resistenzen, welche durch beide Einzeldelationen erreicht wird. Gegen Cefotaxim und Piperacillin ist dieser Stamm dagegen sensitiver als CCCB  $\Delta$ spr0683, jedoch genauso resistent wie CCCB  $\Delta$ spr1851.

Interessanterweise verursacht das Fehlen von *spr0683* und *spr1851* im CCCB-Hintergrund eine Kreuzresistenz gegen mehrere  $\beta$ -Lactame unabhängig von dem ursprünglichen Selektionsantibiotikum.



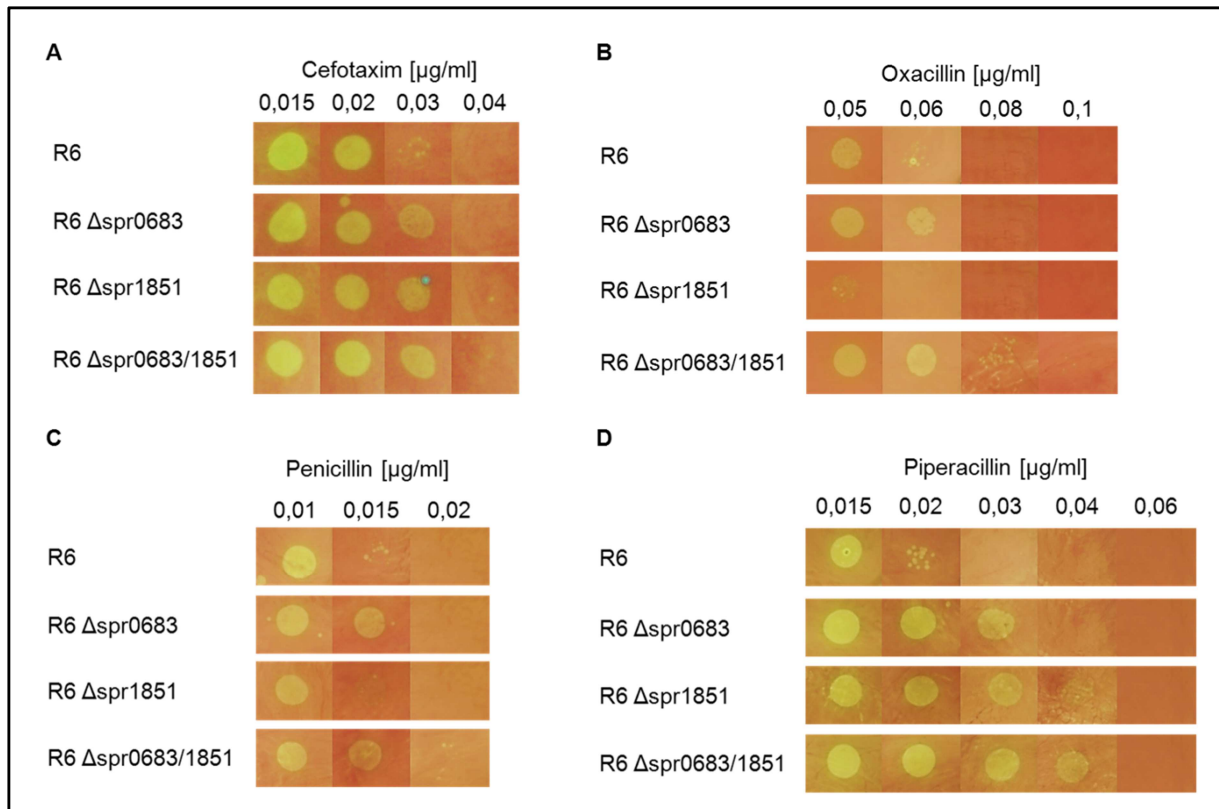
**Abbildung 4.10:  $\beta$ -Lactamresistenz der Deletionsderivate von *spr0683* und *spr1851* in CCCB**

Resistenzprofile der CCCB-Derivate für Cefotaxim (A), Oxacillin (B), Penicillin (C) und Piperacillin (D). Die MHK wurde mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelt.

Das Fehlen der Gene *spr0683* und *spr1851* im sensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6 hat sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die MHK der vier getesteten  $\beta$ -Lactame. Wie in Abbildung 4.11 gezeigt ist, führen alle Deletionsderivate zu einem 1,3-fachen Anstieg der Cefotaximresistenz (Tabelle 4.8). Die Stämme R6  $\Delta\text{spr0683}$  und R6  $\Delta\text{spr0683/1851}$  zeigen den gleichen Resistenzanstieg gegen Oxacillin und Penicillin (Abbildung 4.11 B und C). Die *spr1851*-Deletion führt dagegen nicht zu einem Resistenzanstieg gegen Oxacillin und Penicillin. Stattdessen zeigt dieser Stamm für Oxacillin bereits bei einer Konzentration von 0,05  $\mu\text{g/ml}$  eine Beeinträchtigung des Wachstums während der Wildtyp R6 erst bei einer Konzentration von 0,06  $\mu\text{g/ml}$  beeinträchtigt wird. Wie in Abbildung 4.11 D deutlich gezeigt ist, führen die Deletionen sowohl in R6 als auch in CCCB (s. Abbildung 4.10 D und Tabelle 4.8) für Piperacillin zum größten Resistenzanstieg. In R6 führen

dabei die Deletion von spr1851 alleine als auch die Doppeldeletion zu einer höheren Piperacillinresistenz als das Fehlen von spr0683.

Die Deletionen von spr0683 und spr1851 führen also auch im R6-Hintergrund ohne den Einfluss weiterer Resistenzdeterminanten zu einem Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz. Dies trifft lediglich für die Deletion von spr1851 und die Antibiotika Oxacillin sowie Penicillin nicht zu.



**Abbildung 4.11:  $\beta$ -Lactamresistenz der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 in R6**

Resistenzprofile der R6-Derivate für Cefotaxim (A), Oxacillin (B), Penicillin (C) und Piperacillin (D). Die MHK wurde mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelt.

**Tabelle 4.8: Vermittelte Resistenzhöhung durch die Deletion von spr0683 und spr1851 im Vergleich zu R6 und CCCB**

Stamm	Cefotaxim	Oxacillin	Penicillin	Piperacillin
	x-fache Erhöhung			
CCCB $\Delta$ spr0683	1,4	1,6	1,5	2,5
CCCB $\Delta$ spr1851	1,2	1,6	1,5	2
CCCB $\Delta$ spr0683/1851	1,2	1,6	1,5	2
R6 $\Delta$ spr0683	1,3	1,3	1,3	1,3
R6 $\Delta$ spr1851	1,3	-	-	2
R6 $\Delta$ spr0683/1851	1,3	1,3	1,3	2

Da kein Verlust des Resistenzphänotyps durch die Kombination der spr0683- und spr1851-Deletion zu erkennen ist, scheint ein kompensatorischer Effekt beider Gene nicht vorzuliegen. Auch eine vorstellbare Aufsummierung der Resistenzeffekte durch das Fehlen beider Gene konnte nicht beobachtet werden.

#### **4.3.2.2 Deletionen von spr0683 und spr1851 – Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten**

Im Zuge dieser Arbeit wurde zusätzlich zu den beschriebenen Resistenzphänotypen der Einfluss der Deletionen von spr0683 und spr1851 auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie untersucht.

Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, führen die Deletionen beider Gene in R6 (A) und CCCB (B) zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums. Sowohl die Einzeldelationen als auch die Doppeldelation führen in R6 und CCCB zu einer längeren Generationszeit (Tabelle 4.9). Dabei zeigen die Stämme R6  $\Delta$ spr0683/1851, CCCB  $\Delta$ spr1851 und CCCB  $\Delta$ spr0683/1851 mit einer Generationszeit von jeweils 53 min die größte Beeinträchtigung und wachsen fast doppelt so langsam wie die Rezipienten R6 (28 min) bzw. CCCB (29 min). Die Deletion von spr0683 führt in R6 und CCCB zu ähnlichen Generationszeiten von 43 min bzw. 41 min. R6  $\Delta$ spr1851 wächst mit einer Generationszeit von 46 min dagegen etwas langsamer.

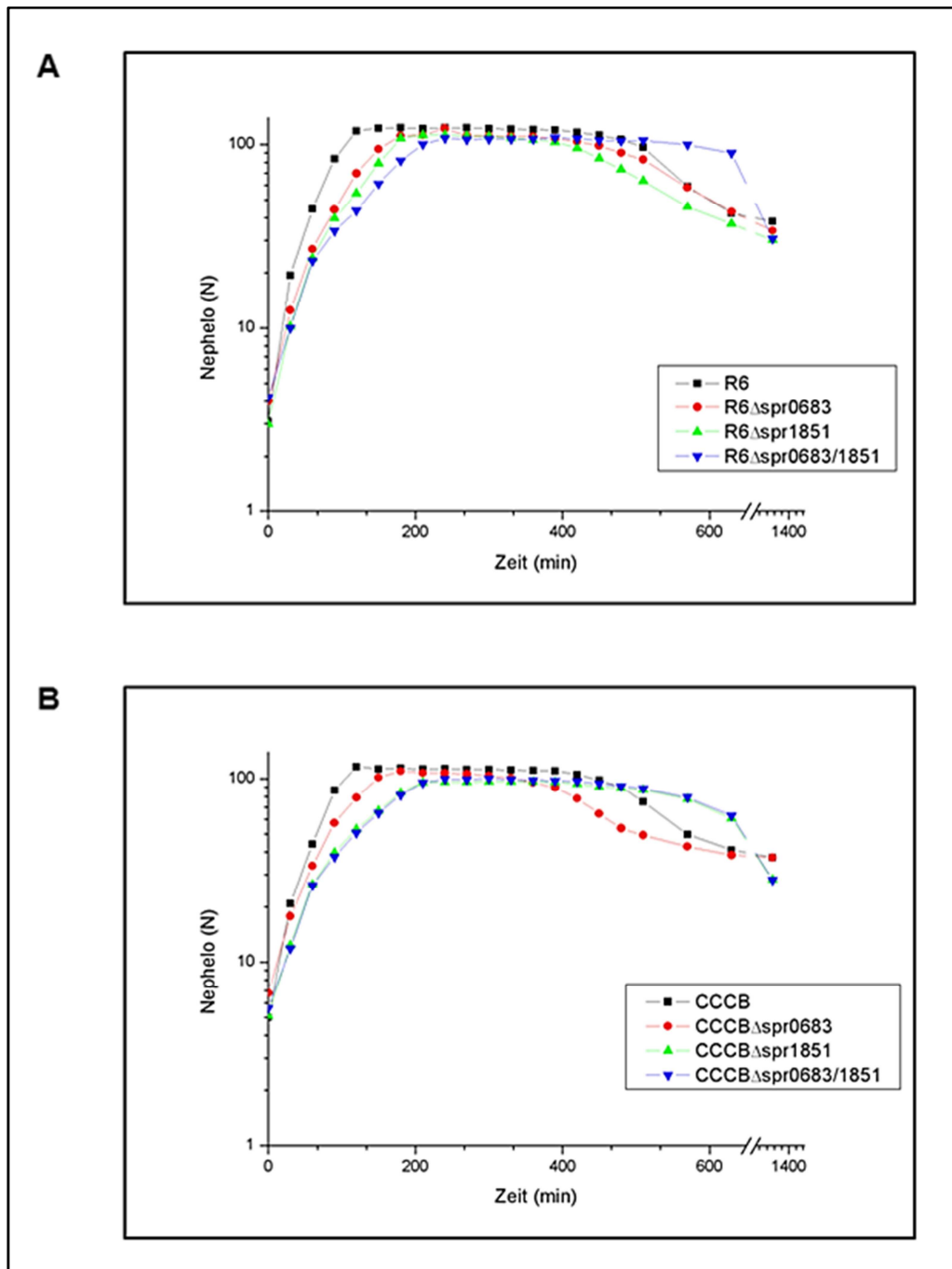
Die Wachstumskurven der Stämme R6  $\Delta$ spr0683/1851, CCCB  $\Delta$ spr1851 und CCCB  $\Delta$ spr0683/1851 zeigen einen ähnlichen Verlauf im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. Jedoch sind diese Kurven aufgrund der langen Generationszeit



---

zeitlich versetzt. CCCB  $\Delta$ spr0683 zeigt dagegen eine leicht verfrühte Lyse. Dieser Lysephänotyp wurde bei mehreren unabhängigen Wachstumsmessungen allerdings nicht immer beobachtet. Die Unterschiede des Lyseverhaltens wurden vermutlich aufgrund verschiedener Chargen des C-Mediums beobachtet.

Morphologisch wurden keine Veränderungen durch das Fehlen der Gene spr0683 und spr1851 festgestellt (nicht gezeigt).



**Abbildung 4.12: Das Wachstum der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851**

Das Wachstum der Deletionsderivate im *S. pneumoniae* R6- (A) und CCCB-Hintergrund (B) wurde in C-Medium mithilfe eines Nephelometers alle 30 min ermittelt.

**Tabelle 4.9: Generationszeit der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851**

Stamm	Generationszeit <sup>1</sup> (min)
R6	28
R6 $\Delta$ spr0683	43
R6 $\Delta$ spr1851	46
R6 $\Delta$ spr0683/1851	53
CCCB	29
CCCB $\Delta$ spr0683	41
CCCB $\Delta$ spr1851	53
CCCB $\Delta$ spr0683/1851	53

1 = Die Generationszeit wurde anhand der Wachstumskurve in Abbildung 4.12 rechnerisch ermittelt.

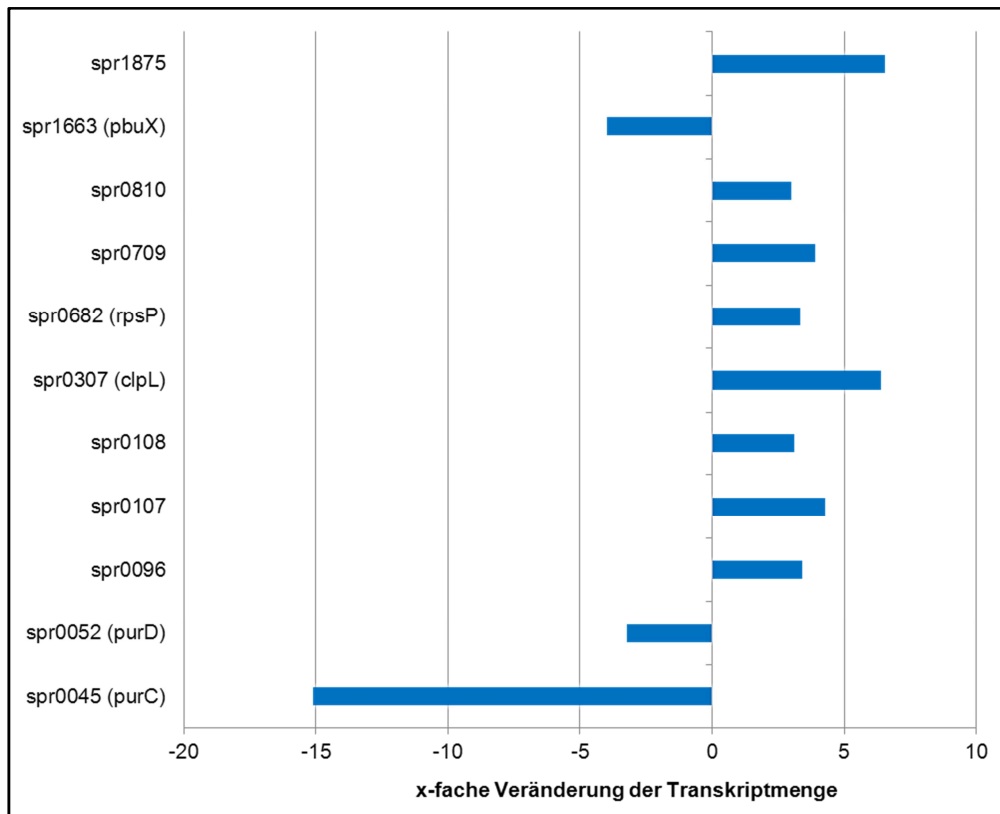
#### 4.3.2.3 Transkriptionsprofile von R6 $\Delta$ spr0683 und R6 spr1851::*janus*

Wie die vorherigen Abschnitte 4.3.2.1 und 4.3.2.2 eindeutig gezeigt haben, wird sowohl die Sensitivität gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika als auch das Wachstumsverhalten durch die Deletion der Gene spr0683 und spr1851 beeinflusst. Da beide Gene für hypothetische Proteine kodieren und man daher keine Kenntnisse über deren Funktion hat, lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Abwesenheit der Gene bzw. Proteine und den beobachteten Effekten nur schwer erklären. Auch die vorhandenen KH- bzw. R3H-Domänen liefern keinen direkten Bezug zur Resistenz oder dem Wachstumsdefekt. Beide Domänen befinden sich in einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlicher Funktion (Dejgaard und Leffers, 1996; Grishin, 1998), unter anderem in Nukleinsäure-bindenden Proteinen. Es wäre daher denkbar, dass auch spr0683 und spr1851 Nukleinsäuren binden und die Expression von Genen beeinflussen. Um dies zu überprüfen wurden im Zuge dieser Arbeit die Transkriptionsprofile der Deletionsderivate R6  $\Delta$ spr0683 (Abbildung 4.13) und R6 spr1851::*janus* (Abbildung 4.14) im Vergleich zum Wildtyp R6 ermittelt. Dieses Screening diente der Identifizierung verändert exprimierter Gene, welche einen möglichen Zusammenhang zu den untersuchten Phänotypen liefern könnten.

Abbildung 4.13 zeigt Gene mit veränderten Transkriptmengen in R6  $\Delta$ spr0683 verglichen mit R6. Dabei sind die intergenen Bereiche nicht dargestellt. Diese sind zusätzlich zu einer Auflistung aller ermittelten Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse sowie der Genprodukte im Anhang in Tabelle 7.1 gezeigt. Drei der elf Gene, für die

veränderte Transkriptmengen festgestellt wurden, weisen eine verringerte Transkriptmenge auf. Hierbei handelt es sich um *purC* und *purD*, deren Genprodukte Enzyme der Purinbiosynthese sind, wobei die Genexpression von *purC* in R6  $\Delta$ spr0683 am stärksten verändert ist. Auch das Gen *pbuX* zeigt eine verringerte Transkriptmenge. PbuX ist eine membranständige Xanthin-Permease, welche durch die Beteiligung am Purinmetabolismus wie die *pur*-Gene mit dem Nukleotidstoffwechsel in Verbindung gebracht werden kann.

Bei den acht Genen mit erhöhten Transkriptmengen handelt es sich vor allem um Gene mit drei- bis fünffach moderat veränderten Expressionsniveaus. Hierzu zählt zum einen ein Cluster, welches die hypothetischen Gene spr0096, spr0107 und spr0108 beinhaltet. Interessanterweise kodieren sowohl spr0096 als auch spr1875, welches ebenfalls eine erhöhte Genexpression zeigt, für Proteine mit einer vermeintlichen LysM-Domäne. Diese Domäne verleiht möglicherweise eine Peptidoglykan-bindende Funktion und findet sich in einer Vielzahl von Enzymen, welche im Zellwandabbau involviert sind (Buist *et al.*, 2008). Das Gen *clpL*, welches zum Kompetenzregulon zählt (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004), gehört zu den Genen mit stärker verändertem Expressionsniveau. Bei ClpL handelt es sich um die ATP-bindende Untereinheit einer ATP-abhängigen Protease. ClpL gehört zur Clp/HSP100-Proteinfamilie (**c**aseinolytic **p**rotease/**h**eat **s**hock **p**rotein) und wird bei Stress induziert (Choi *et al.*, 1999). Ein weiteres Gen mit erhöhter Transkriptmenge ist *rpsP*, das ribosomale Protein S16 der 30S ribosomalen Untereinheit. Zwei weitere hypothetische Gene, spr0709 und spr0810, zeigen ebenfalls eine erhöhte Genexpression. Blast-Analysen der Genprodukte deuten bei Spr0709 auf ein vermutliches Membranprotein hin, während Spr0810 scheinbar zur Familie der PspC-Domänen-Proteine zählt.



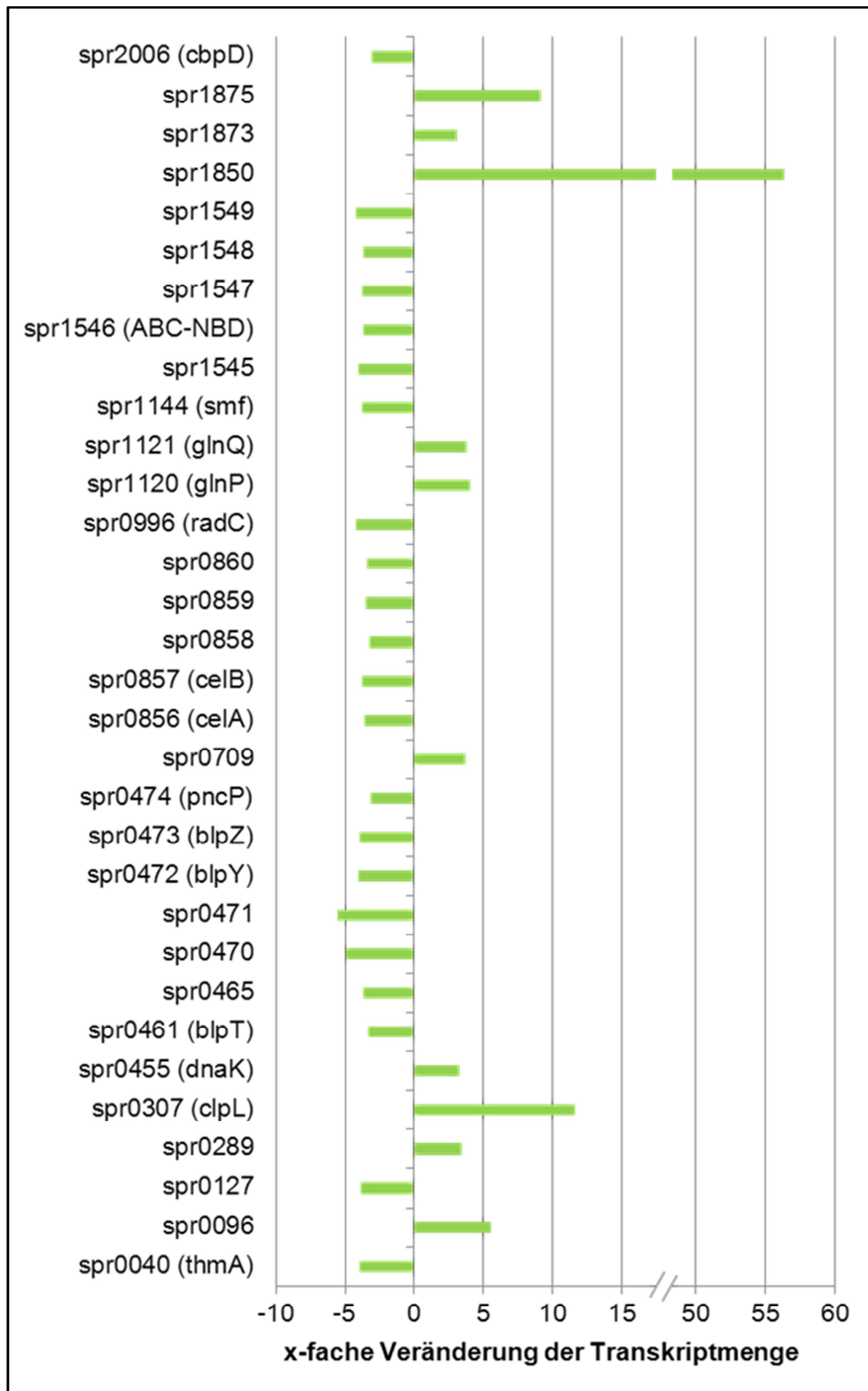
**Abbildung 4.13: Transkriptionsprofil von R6  $\Delta$ spr0683**

Dargestellt ist die Veränderung der Transkriptmenge von Genen aus R6  $\Delta$ spr0683 im Vergleich zum Wildtyp R6. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte bei einer Nephelo von ca. 40. Die Ergebnisse beruhen auf vier Hybridisierungen auf dem R6/TIGR4-Slide. Die intergenen Bereiche aus R6 und TIGR4 sowie die TIGR4-Gene und spr0683 sind nicht wiedergegeben. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und mit einem P-Wert kleiner 1 %.

In Abbildung 4.14 sind die Gene aus R6 spr1851::*janus* gezeigt, die im Vergleich zum Wildtyp R6 eine veränderte Genexpression aufweisen. Die intergenen Bereiche sowie die Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse aller Gene sind im Anhang in Tabelle 7.2 aufgelistet. Abbildung 4.14 zeigt die 32 Gene mit veränderter Transkriptmenge. Eine Vielzahl dieser Gene wird in dem Deletionsderivat moderat (in etwa drei- bis sechsfach) geringer exprimiert. Bei diesen 22 Genen handelt es sich um vier größere Cluster und mehrere einzelne Gene. Betroffen sind vor allem Gene der Bacteriocinproduktion und -immunität wie *thmA*, spr0127, *blpT*, spr0465 und das Cluster spr0470 bis spr0474 mit *blpY*, *blpZ* und *pcnP* außer spr0471 (De Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007). Ein weiterer großer Anteil dieser verringert transkribierten Gene betrifft das Kompetenzregulon. Hierzu zählen spr0127, die Cluster spr0472 bis spr0474 (*blpY*, *blpZ* und *pcnP*) sowie spr0856 bis spr0860 mit den Genen *celA* und *celB*, welche für Kompetenzproteine kodieren, *radC*, *smf* sowie *cbpD* (Rimini *et al.*,

2000; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004; Claverys und Håvarstein, 2007). Ebenfalls eine verringerte Transkriptmenge weist das Cluster mit den Genen von spr1545 bis spr1549 auf. Während das Genprodukt von spr1546 einen ABC-Transporter darstellt, kodieren die übrigen Gene dieses Clusters für hypothetische Proteine. Blast-Analysen von spr1545, spr1547 und spr1548 deuten auf vermutliche Membranproteine hin.

Unter den zehn Genen mit einer erhöhten Transkriptmenge sind vier Gene, welche auch im Stamm R6  $\Delta$ spr0683 eine höhere Expression zeigten: die beiden Gene mit einer möglichen LysM-Domäne, spr0096 und spr1875, sowie spr0709 und das am zweit stärksten höher exprimierte Gen *clpL*. Zudem konnte eine erhöhte Expression von *dnaK*, einem weiteren Hitzeschockprotein-kodierenden Gen, festgestellt werden. *DnaK* gehört wie auch *clpL* zum Kompetenzregulon (Rimini *et al.*, 2000; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Spr0289 und spr1873, zwei weitere Gene mit hypothetischen Genprodukten, sind in dem Deletionsderivat höher transkribiert. Des Weiteren finden sich auch in dem Transkriptionsprofil von R6 spr1851::*janus* mit *glnP* und *glnQ* Gene des Stickstoffmetabolismus, die für einen Glutamin-Transporter kodieren (Kloosterman *et al.*, 2006). Das Gen spr1850 zeigt mit einer in etwa 56-fach gesteigerten Transkriptmenge bei weitem den größten Unterschied der untersuchten Genexpressionen. Dies kommt, wie zu Beginn des Abschnitts 4.3.2 bereits erwähnt wurde, durch die Deletion des upstream-gelegenen Gens spr1851 mithilfe der Januskassette zustande. Der starke Promotor der Januskassette führt in diesem Deletionsderivat offenbar zu einem bedeutenden Anstieg der Transkriptmenge von spr1850. Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass das ermittelte Transkriptionsprofil nicht allein durch das Fehlen von spr1851 sondern möglicherweise auch durch die sehr starke Expression von spr1850 beeinflusst wurde.



**Abbildung 4.14: Transkriptionsprofil von R6 spr1851::janus**

Dargestellt ist die Veränderung in der Transkriptmenge von Genen aus R6 spr1851::janus im Vergleich zum Wildtyp R6. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte bei einer Nephelo von ca. 40. Die Ergebnisse beruhen auf vier Hybridisierungen auf dem R6/TIGR4-Slide. Die intergenen Bereiche aus R6 und TIGR4 sowie die TIGR4-Gene und spr1851 sind nicht wiedergegeben. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und mit einem P-Wert kleiner 1 %.

Mithilfe dieser Screening-Methode findet sich eine Vielzahl an Genen, welche in den Deletionsderivaten höher- bzw. niedriger exprimiert werden. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Deletionen beider Gene und dem beobachteten Resistenzanstieg wurde zunächst ein Gen, welches bereits mit Resistenz in Verbindung gebracht wurde, betrachtet. So konnten Tran *et al.* (2011) zeigen, dass eine Überexpression von ClpL zu einem Anstieg der Penicillinresistenz führt. Interessanterweise zeigte sich bei beiden Deletionsderivaten eine deutlich höhere Transkriptmenge des Gens *clpL* im Vergleich zum Wildtyp. Aufgrund dessen wurde ein möglicher Einfluss von *clpL* in Kombination mit dem Fehlen von *spr0683* und *spr1851* näher untersucht.

### 4.3.3 Der Einfluss von ClpL auf die Phänotypen der Deletionsderivate

Wie in Abschnitt 4.3.2.3 deutlich gezeigt wurde ist die Transkriptmenge von *clpL* bei beiden Deletionsderivaten im Vergleich zum Wildtyp R6 erhöht. In R6  $\Delta$ *spr0683* zeigt dieses Gen eine in etwa sechsfach höhere Expression, wohingegen es in R6 *spr1851::janus* annähernd zwölfmal höher reguliert ist (s. Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den beobachteten Phänotypen der Deletionsderivate und einer erhöhten *clpL*-Menge wurde die inverse Methode einer *clpL*-Deletion gewählt. Diese erfolgte wie in Abschnitt 3.26.6 beschrieben mithilfe einer Kanamycin-Resistenzkassette (*aphIII*). Diese *clpL*-Deletion wurde in Kombination mit den Einzel- bzw. der Doppeldeletion von *spr0683* und *spr1851* in die entsprechenden R6- und CCCB-Stämme eingebracht. Um einen möglichen Effekt der stark erhöhten Transkriptmenge des Gens *spr1850* auszuschließen wurden wie bereits in den Abschnitten 4.3.2.1 und 4.3.2.2 die Deletionsstämme mit dem *spr1851*-Minigen verwendet.

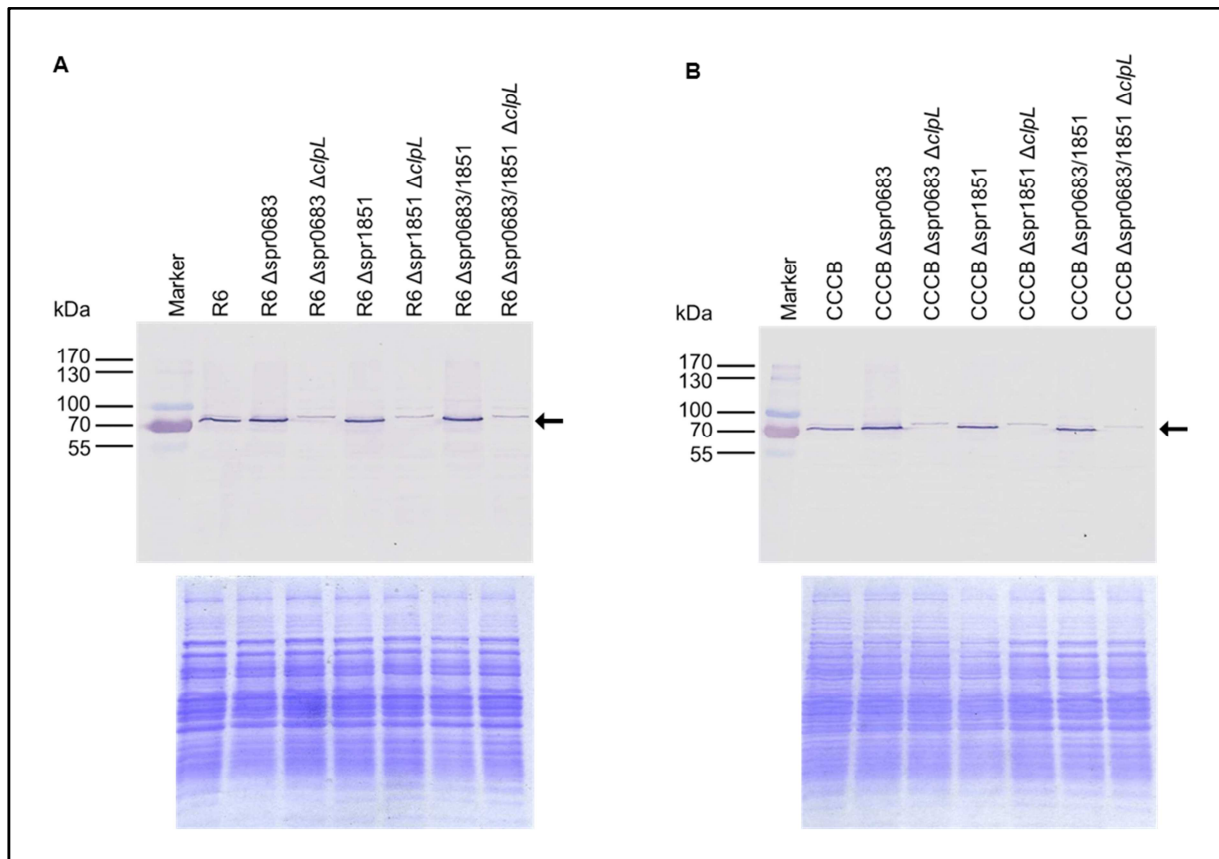
Die Arbeiten von Tran *et al.* (2011) zeigten, dass Stämme mit überexprimiertem ClpL eine erhöhte Penicillinresistenz sowie eine verlängerte Generationszeit aufweisen. Zudem stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass eine induzierte ClpL-Überexpression einer Erhöhung der PBP2x-Menge zur Folge hatte. Aufgrund dessen wurden im Folgenden die Auswirkungen einer *clpL*-Deletion in Kombination mit dem Fehlen von *spr0683* und *spr1851* auf die zuvor beobachteten Phänotypen untersucht.



#### 4.3.3.1 Die ClpL-Menge in den Deletionsderivaten von spr0683 und spr1851

Anhand der Transkriptionsprofile konnte eine erhöhte Genexpression von *clpL* in den Deletionsderivaten festgestellt werden. Allerdings kann aus diesen Daten nicht auf die Proteinmenge von ClpL geschlossen werden. Deshalb wurden zunächst mithilfe eines Western Blots und Antikörpern gegen ClpL (Tran *et al.*, 2011) die vorhandenen Proteinmengen der Deletionsderivate mit denen der Ausgangsstämme R6 und CCCB verglichen.

Abbildung 4.15 zeigt die Western Blot-Analyse der Deletionsderivate mit einem ClpL-Antikörper. ClpL aus *S. pneumoniae* hat ein Molekulargewicht von ca. 78 kDa. Wie anhand der Abbildung zu sehen ist, ist die ClpL-Menge in den Deletionsderivaten von spr0683 bzw. spr1851 leicht erhöht. Dies trifft sowohl auf das Fehlen der Gene im R6- als auch im CCCB-Hintergrund zu. Eine sechs- bis nahezu zwölffache Erhöhung wie in der Transkriptmenge von *clpL* wird allerdings auf der Proteinebene nicht sichtbar. Auch die ClpL-Menge in den Deletionsderivaten von spr1851, welche das spr1851-Minigen besitzen, ist erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte Transkriptmenge von *clpL* des Stammes R6 spr1851::*janus* (s. Abbildung 4.14) tatsächlich aus der Deletion dieses Gens resultiert.



**Abbildung 4.15: Western Blot zur Detektion der ClpL-Menge in den R6- und CCCB-Derivaten**

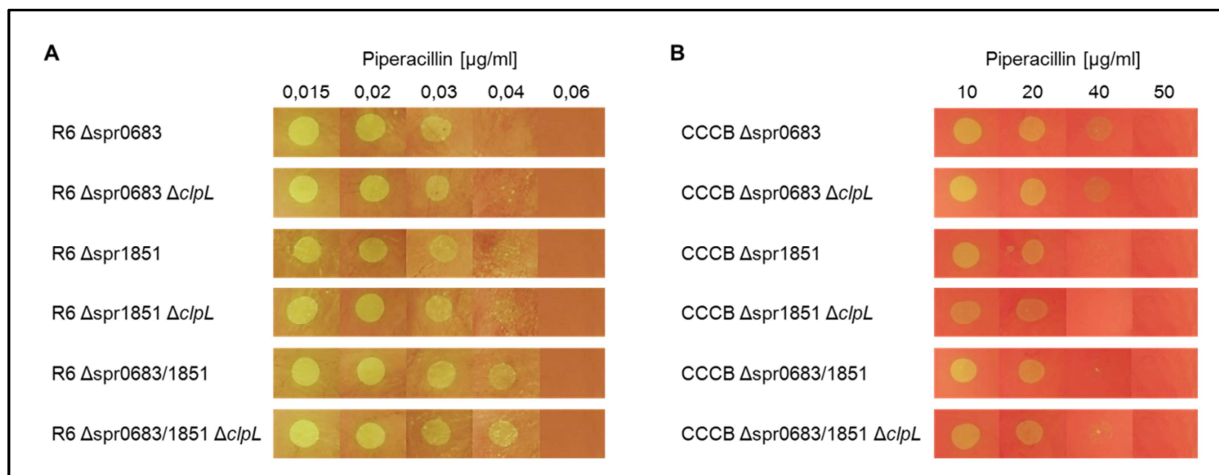
Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse zum Vergleich der ClpL-Menge (oben) und eine Coomassie-Färbung des Gesamtproteins zum Abgleich der aufgetragenen Lysatmengen (unten). Teil (A) zeigt die R6-Derivate, in Teil (B) sind die CCCB-Derivate dargestellt. Die Präparation der Zellysate erfolgte nach Standardmethoden. Die Zellysate wurden durch ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der primäre Antikörper (Anti-ClpL) wurde in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt, der sekundäre Antikörper (Anti-mouse Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase) in einer 1:1.000 Verdünnung. Marker: pEqGoldIV. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe von ClpL. *S. pneumoniae* R6 ClpL hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 78 kDa.

#### 4.3.3.2 Der Einfluss einer *cplL*-Deletion auf die $\beta$ -Lactamresistenz und das Wachstum der Deletionsderivate von *spr0683* und *spr1851*

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass neben der Transkriptmenge von *cplL* auch die Proteinmenge durch das Fehlen der Gene *spr0683* und *spr1851* leicht erhöht ist. Aufgrund dessen wurden die Auswirkungen des Fehlens von *cplL* auf die Phänotypen der *spr0683*- und *spr1851*-Deletionsderivate untersucht.

Zunächst wurde der Effekt der *cplL*-Deletion auf die Resistenz gegen die  $\beta$ -Lactame Cefotaxim, Oxacillin, Penicillin und Piperacillin getestet. Die Piperacillinresistenz wurde durch das Fehlen der Gene *spr0683* und *spr1851* sowohl in R6 als auch in

CCCB am stärksten erhöht (s. Tabelle 4.8). Aus diesem Grund sind in Abbildung 4.16 lediglich die Resistenzen der untersuchten Stämme gegen Piperacillin gezeigt. Die Deletion von *c/pL* führt allerdings in keinem Stamm zu einer Veränderung der Piperacillinresistenz. Dies trifft ebenfalls für die getesteten  $\beta$ -Lactamantibiotika Cefotaxim, Oxacillin und Penicillin zu (nicht gezeigt). Die bereits ermittelten MHK-Werte der spr0683- und spr1851-Deletionsderivate (s. Abschnitt 4.3.2.1) werden durch die *c/pL*-Deletion nicht beeinflusst.



**Abbildung 4.16: Piperacillinresistenz der *c/pL*-Deletionsderivate**

Gezeigt ist die mithilfe der Agardilutionsmethode ermittelte Piperacillinresistenz der R6- (A) und CCCB- (B) Derivate.

Weitere phänotypische Auswirkungen der spr0683- und spr1851-Deletionsderivate, die Wachstumsdefekte, wurden ebenfalls im Hinblick auf einen ClpL-vermittelten Einfluss untersucht.

In Tabelle 4.10 sind die ermittelten Generationszeiten der getesteten Stämme aufgelistet. Die Generationszeiten der R6-Derivate zeigen keinen Unterschied zwischen den Stämmen mit oder ohne *c/pL*. Genauso verhält es sich bei CCCB  $\Delta\text{spr1851}$ . Das Fehlen von *c/pL* hat auch in diesem Stamm keinen Einfluss auf die Generationszeit. Während der Stamm CCCB  $\Delta\text{spr0683}$  (41 min) durch die *c/pL*-Deletion eine geringfügig verlängerte Generationszeit von 43 min aufweist, führt das Fehlen von *c/pL* in CCCB  $\Delta\text{spr0683/1851}$  (53 min) zu einer etwas kürzeren Generationszeit von 50 min. Die Deletion von *c/pL* hat lediglich bei zwei Stämmen eine minimale Veränderung der Generationszeit zur Folge. Der Wachstumsdefekt, welcher durch das Fehlen der Gene spr0683 und spr1851 zustande kommt, wird folglich nicht durch ClpL beeinflusst.

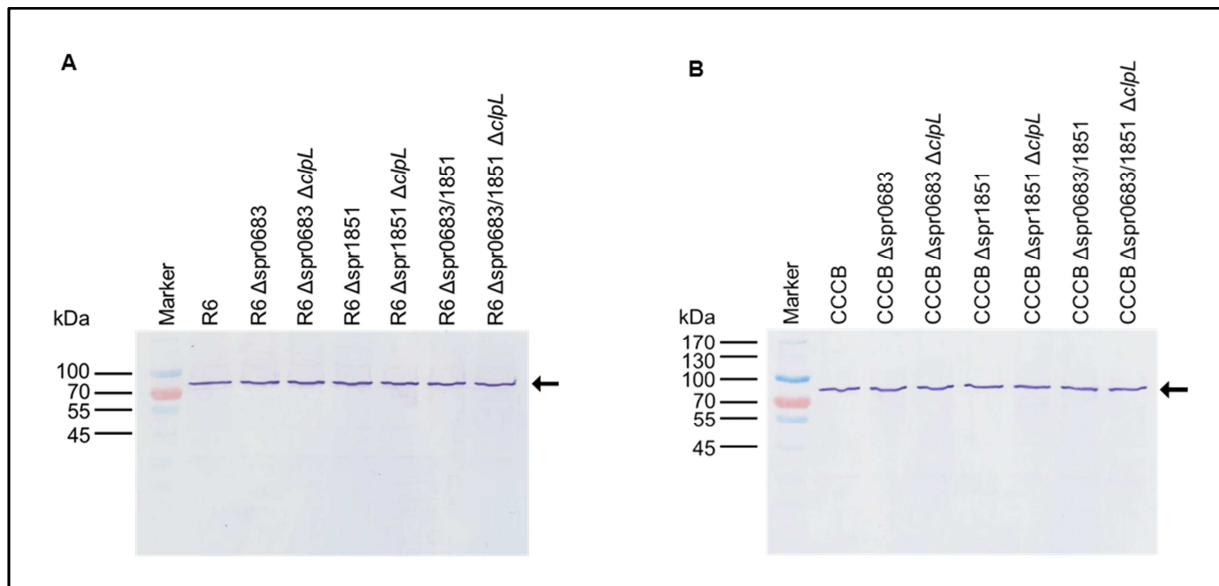
**Tabelle 4.10: Der Effekt der *clpL*-Deletion auf die Generationszeit der *spr0683*- und *spr1851*-Deletionsderivate**

Stamm	Generationszeit <sup>1</sup> (min)
R6 $\Delta$ <i>spr0683</i>	43
R6 $\Delta$ <i>spr0683</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	43
R6 $\Delta$ <i>spr1851</i>	46
R6 $\Delta$ <i>spr1851</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	46
R6 $\Delta$ <i>spr0683/1851</i>	53
R6 $\Delta$ <i>spr0683/1851</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	53
CCCB $\Delta$ <i>spr0683</i>	41
CCCB $\Delta$ <i>spr0683</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	43
CCCB $\Delta$ <i>spr1851</i>	53
CCCB $\Delta$ <i>spr1851</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	53
CCCB $\Delta$ <i>spr0683/1851</i>	53
CCCB $\Delta$ <i>spr0683/1851</i> $\Delta$ <i>clpL</i>	50

1 = Die Generationszeit wurde anhand der Wachstumskurve (nicht gezeigt) rechnerisch ermittelt.

#### 4.3.3.3 Der Einfluss der ClpL-Menge auf die PBP2x-Menge

Wie anhand von Abbildung 4.15 gezeigt wird ist die Menge an ClpL in den *spr0683*- und *spr1851*-Deletionsderivaten gegenüber R6 bzw. CCCB leicht erhöht. Aufgrund der Beobachtung, dass eine induzierte ClpL-Überexpression in einer gesteigerten PBP2x-Menge und einem Resistenzanstieg resultierte (Tran *et al.*, 2011), wurde die Menge an PBP2x in den Deletionsderivaten mithilfe von Antikörpern gegen PBP2x in den verschiedenen Stämmen getestet (Abbildung 4.17). In keinem Fall konnten Unterschiede der PBP2x-Menge in den unterschiedlichen Derivaten detektiert werden. Das bedeutet, dass weder die Deletion der Gene *spr0683* und *spr1851* noch eine erhöhte Menge an ClpL oder eine Deletion von *clpL* einen Einfluss auf die PBP2x-Menge haben.



**Abbildung 4.17: Western Blot zur Detektion der PBP2x-Menge in den R6- und CCCB-Derivaten**

Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse zum Vergleich der PBP2x-Menge. Die dazugehörige Coomassie-Färbung des Gesamtproteins zum Abgleich der aufgetragenen Lysatmengen ist in Abbildung 4.15 (unten) dargestellt. Teil (A) zeigt die R6-Derivate, in Teil (B) sind die CCCB-Derivate dargestellt. Die Präparation der Zelllysate erfolgte nach Standardmethoden. Die Zelllysate wurden durch ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der primäre Antikörper (Anti-PBP2x) wurde in einer 1:10.000 Verdünnung eingesetzt, der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase) in einer 1:30.000 Verdünnung. Marker: peqGoldIV. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe von PBP2x. *S. pneumoniae* R6 und *S. mitis* PBP2x haben ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 82 kDa.

## 5 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung und Charakterisierung von Resistenzdeterminanten, die mittels horizontalem Gentransfer von dem hochresistenten *S. mitis* B6 auf *S. pneumoniae* übertragen werden können. Als Ausgangspunkt dafür dienten Transformanten des sensitiven *S. pneumoniae* R6, die durch stufenweise Transformation mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA und  $\beta$ -Lactamselektion erhalten worden waren. Dabei wurden sukzessive in nur vier Transformationsschritten alle hmw PBP verändert (Hakenbeck *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden bisher ungeklärte Faktoren der Resistenzentwicklung dieser Transformantenfamilie untersucht. Unter anderem wurde der Beitrag von PBP2a<sub>B6</sub> zur  $\beta$ -Lactamresistenz in Gegenwart von PBP2x<sub>B6</sub> untersucht. Des Weiteren konnte die Ursache des Resistenzunterschieds zwischen CCCO und CCCB, zwei Transformanten der vierten Stufe mit gleichem Profil nieder-affiner PBP, ermittelt werden. Von weiterem Interesse war die Identifizierung möglicher neuer Resistenzdeterminanten, welche von *S. mitis* B6 auf den bereits hochresistenten Stamm CCCB übertragen werden könnten. In diesem Zusammenhang konnten Mutanten mit erhöhter  $\beta$ -Lactamresistenz isoliert werden. Dieser Resistenzanstieg kann mit der Inaktivierung von zwei Genen, welche für hypothetische Proteine kodieren, in Verbindung gebracht werden. Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse dieser Deletionsderivate.

### 5.1 *Streptococcus mitis* B6 PBP2a und die $\beta$ -Lactamresistenz

PBP2a spielt häufig keine Rolle für die Resistenz klinischer Isolate. Allerdings konnten niedrig-affine PBP2a-Varianten in einigen Fällen nachgewiesen werden, die sich nur in bis zu 3 % der Aminosäuresequenz von sensitiven PBP2a unterscheiden und offenbar zur Resistenz beitragen (Du Plessis *et al.*, 2000; Sanbongi *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005). Der geringe Sequenzunterschied erschwert die Identifizierung von Rekombinationsereignissen in diesem Gen, erleichtert dagegen die Suche nach resistenzrelevanten Mutationen. Genomische Hybridisierungsexperimente lassen vermuten, dass *S. mitis*-Stämme, eine Donorspezies für veränderte PBP in

*S. pneumoniae*, generell sehr ähnliche *pbp2a* Gene verglichen mit *S. pneumoniae* besitzen (Hakenbeck *et al.*, 2001). Entsprechend ähnlich ist PBP2a aus *S. mitis* B6 zu PBP2a aus *S. pneumoniae* (Denapaité *et al.*, 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass PBP2a<sub>B6</sub> in Gegenwart eines niedrig-affinen PBP2x<sub>B6</sub> oder PBP2x klinischen Ursprungs einen weiteren Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz vermittelt (Hakenbeck *et al.*, 1998; Rutschmann, 2011). Die PBP2x<sub>B6</sub>-vermittelte Resistenz wurde dabei allerdings in der Transformante R6 C<sub>T3</sub> (s. Abbildung 2.4 A) untersucht (Hakenbeck *et al.*, 1998), bei der weitere veränderte Genloci vorhanden sind, die einen Einfluss auf die Resistenz haben könnten.

Der Einfluss von PBP2a<sub>B6</sub> auf die Cefotaximresistenz wurde daher in einer Transformante von *S. pneumoniae* R6 untersucht, in die das PBP2x<sub>B6</sub> transformiert worden war (s. Abschnitt 4.1). Der Stamm R6 2x<sub>B6</sub>, welcher ein PBP2x mit *S. mitis* B6-Sequenz von Aminosäure 46-176 und 281-600 aufweist, zeigt einen neunfachen Anstieg der Cefotaxim-MHK. Die Resistenzentwicklung beruht dabei vermutlich auf dem Austausch der gesamten Transpeptidase-Domäne des niedrig-affinen PBP2x<sub>B6</sub>, welche unter anderem fünf Aminosäureänderungen aufweist, die als resistenzrelevant identifiziert wurden (Mouz *et al.*, 1998; Mouz *et al.*, 1999; Dessen *et al.*, 2001; Chesnel *et al.*, 2003; Smith und Klugman, 2005; Carapito *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2007; Zeffass *et al.*, 2009). Dazu zählt auch eine der am besten charakterisierten Substitutionen, T338A, welche sich direkt neben dem aktiven Serin in einem der konservierten Motive des aktiven Zentrums von PBP2x befindet. Diese Substitution führt durch den Verlust der Hydroxyl-Gruppe und der stabilisierenden Bindung eines Wassermoleküls zu einer Destabilisierung des aktiven Zentrums. Dies hat letztendlich eine Reduktion der Acylierung des aktiven Serins durch  $\beta$ -Lactamantibiotika zur Folge (Mouz *et al.*, 1998; Dessen *et al.*, 2001).

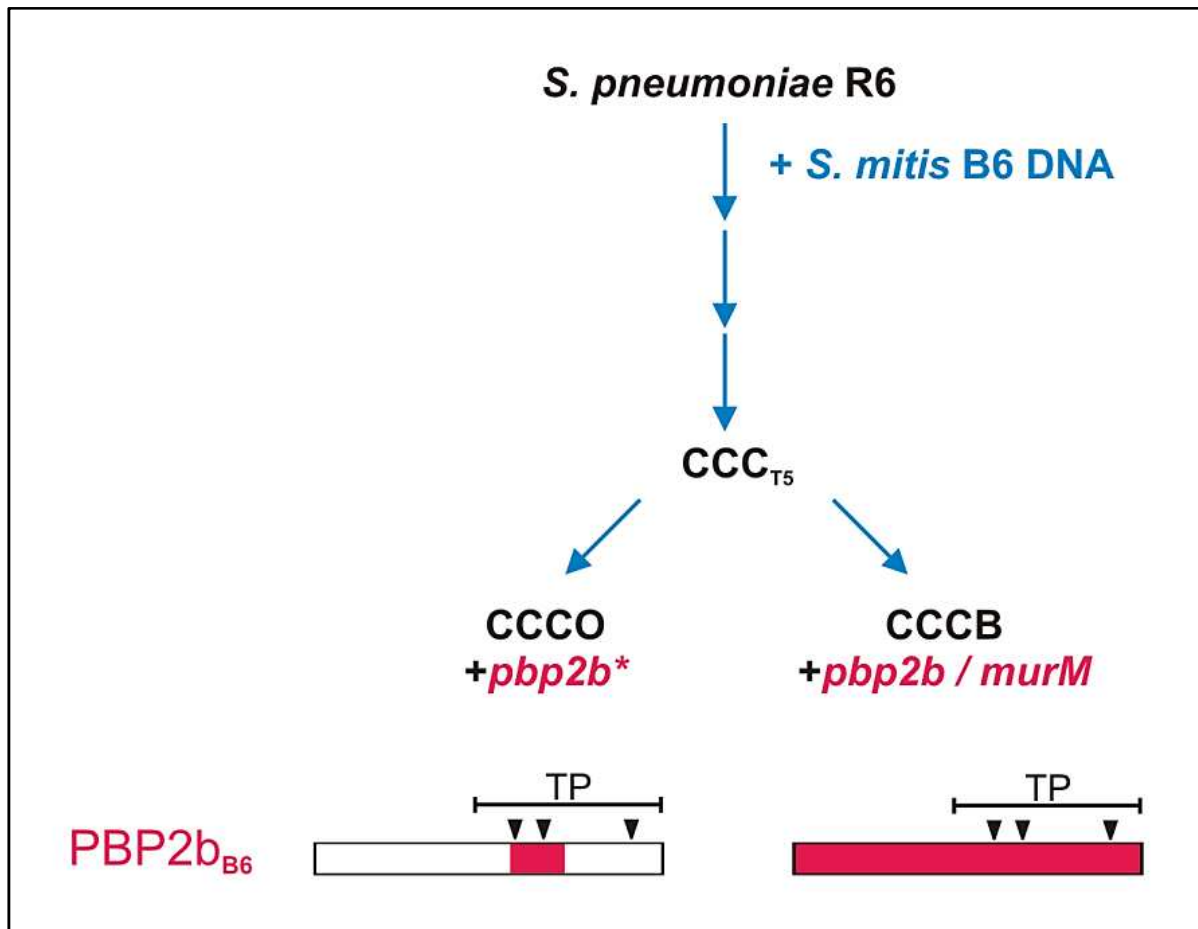
Durch die nachfolgende Transformation des amplifizierten *pbp2a*<sub>B6</sub> konnte der Stamm R6 2x<sub>B6</sub>2a<sub>B6</sub> generiert werden. Die *S. mitis* B6-Sequenz in der Transformante beginnt direkt anschließend an das aktive Serin (Aminosäure 411-633) und beinhaltet mit den drei konservierten Motiven einen großen Bereich der Transpeptidase Domäne aus PBP2a<sub>B6</sub>. Dies führte zu einem zehnfachen Resistenzanstieg gegen Cefotaxim. In diesem Bereich liegen sieben Veränderungen gegenüber PBP2a von *S. pneumoniae* R6. Davon konnte die T411A-Substitution aus PBP2a<sub>B6</sub> in einigen klinischen Isolaten nachgewiesen werden und wurde bereits mit Cefotaximresistenz assoziiert (Sanbongi *et al.*, 2004). Allerdings konnte Rutschmann

(2011) zeigen, dass diese Substitution isoliert betrachtet zwar die Affinität gegenüber Bocillin verringert aber keinen signifikanten Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz vermittelt. Auch die häufig zusätzlich auftretende Substitution Q431L führt alleine oder in Kombination mit der T411A-Substitution zu keinem Anstieg der Cefotaximresistenz. Es scheint, dass hierzu mehrere Austausche verteilt über die gesamte Transpeptidase-Domäne notwendig sind (Rutschmann, 2011). Dazu zählen vermutlich auch die Substitutionen, die sich im C-terminalen Bereich der Transpeptidase-Domäne von PBP2a<sub>B6</sub> befinden und in R6 2x<sub>B6</sub>2a<sub>B6</sub> ebenfalls verändert vorliegen. Der Stamm R6 2x<sub>B6</sub>2a<sub>B6</sub> hatte eine geringere Cefotaximresistenz im Vergleich zu R6 CC<sub>T1</sub>, welcher ebenfalls ein niedrig-affines PBP2x<sub>B6</sub> und PBP2a<sub>B6</sub> enthält (s. Abbildung 2.4). Dies könnte auf zusätzliche Veränderungen in R6 CC<sub>T1</sub> zurückzuführen zu sein (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung), die durch eine Genomsequenzierung ermittelt werden könnten. Gezielte Transformationsversuche mit einzelnen veränderten Genen und anschließender Bestimmung ihres möglichen Resistenzpotentials könnten anschließend durchgeführt werden.

## 5.2 Genomischer Unterschied zwischen CCCO und CCCB – die MurM- und PBP2b-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen die beiden Stämme der vierten Transformationsstufe CCCO und CCCB, die trotz des gleichen Profils niedrig-affiner PBP unterschiedlich hohe  $\beta$ -Lactamresistenzen aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedliche Rekombinationsereignisse in MurM und PBP2b mit *S. mitis* B6 DNA als Ursache für die verschiedenen Resistenzphänotypen dieser beiden Stämme identifiziert werden (Abbildung 5.1).





**Abbildung 5.1: Genomischer Unterschied zwischen CCCO und CCCB**

Ausgehend vom sensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6 wurden in vier Transformations- und Selektionsschritten mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA (blau) sukzessive alle fünf hmw PBP verändert. Im letzten Schritt wurde bei CCCO ein kleiner Teil der Transpeptidase-Domäne (TP; Dreiecke = konservierte Motive) von  $PBP2b_{B6}$  übertragen (\* = Aminosäure 383-489) während CCCB zusätzlich zu dem kompletten PBP2b auch MurM (bis auf Aminosäure 82-88) aus *S. mitis* B6 aufweist.

### 5.2.1 Die MurM-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz

Mithilfe von DNA-Microarray-Analysen (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung) konnte *murM* als einer der genomischen Unterschiede zwischen CCCO und CCCB ermittelt werden. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei MurM um eine Aminoacyl-Ligase, die für die Anheftung der ersten Aminosäure (L-Serin oder L-Alanin) der Interpeptidbrücke des Peptidoglykans verantwortlich ist und bereits mit  $\beta$ -Lactamresistenz assoziiert werden konnte (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000).  $MurM_{CCCB}$  besteht bis auf drei Aminosäuren aus *S. mitis* B6-Sequenz und weist somit eine Mosaikstruktur auf. Interessanterweise existieren ähnliche Sequenzblöcke der Mosaikstruktur auch in hochresistenten Isolaten von

*S. pneumoniae*, *S. mitis* und *S. oralis* und unter anderem auch in *S. pneumoniae* Hu17 (Filipe und Tomasz, 2000; Filipe *et al.*, 2000; Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Der Polymorphismus von *murM* in *S. pneumoniae* lässt vermuten, dass dieses Gen das Produkt von horizontalem Gentransfer ist. Die Ähnlichkeit zu MurM<sub>B6</sub> zeigt hier erstmals, dass auch in diesem Fall *S. mitis* eine wahrscheinliche Donorspezies ist ähnlich wie bei den *pbp* Genen resistenter *S. pneumoniae*.

Um das Resistenzpotential von *murM*<sub>B6</sub> zu untersuchen und mögliche Bereiche, die für die Resistenz wichtig sind, definieren zu können wurden die drei Allele *murM*<sub>CCCB</sub>, *murM*<sub>B6</sub> und *murM*<sub>Hu17</sub> (MurM-Vergleich, s. Abbildung 4.2) anstelle des ursprünglichen *murM*<sub>R6</sub> in CCCO eingebracht. Jedes der untersuchten *murM* Allele führt zu einem Resistenzanstieg gegen Cefotaxim (s. Abschnitt 4.2.1.1). Während das Derivat aus Hu17 die geringste Erhöhung der MHK vermittelt, konnte durch MurM<sub>CCCB</sub> sogar die Cefotaximresistenz des Donors CCCB erreicht werden. Einen noch stärkeren Resistenzanstieg vermittelt MurM<sub>B6</sub>. Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch die drei zusätzlich veränderten Aminosäuren in MurM<sub>B6</sub> gegenüber MurM<sub>CCCB</sub> eine Rolle bei der Resistenzvermittlung spielen, folglich die Funktion von MurM betreffen.

Im Gegensatz zur Cefotaximresistenz, deren CCCB-Niveau durch einen Austausch des MurM<sub>CCCB</sub> in CCCO erreicht wird, ergab sich für die Resistenzprofile für Penicillin wie auch Piperacillin (nicht gezeigt) ein völlig anderes Bild. Die neunfach höhere Penicillin-MHK von CCCB im Vergleich zu CCCO kann durch keines der *murM* Allele vermittelt werden. Während das *murM*<sub>Hu17</sub> Allel zu einer Verdopplung der Penicillinresistenz in CCCO führt, verändert sich die MHK durch die *murM* Allele aus CCCB und B6 nur geringfügig.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der drei *murM* Allele auf die Resistenz gegen verschiedene  $\beta$ -Lactamantibiotika sind auf ihre unterschiedlichen Sequenzen zurückzuführen. Mosaikblöcke in MurM resistenter Pneumokokken variieren meist in mehr als 10 % auf Aminosäureebene zu denen sensitiver Stämme (Filipe und Tomasz, 2000). Dies trifft auch auf die hier untersuchten *murM* Allele zu (s. Abschnitt 4.2.1). Eine erhöhte Anzahl verzweigter Muropeptide, welche eine L-Serin-L-Alanin- oder L-Alanin-L-Alanin-Interpeptidbrücke aufweisen, konnte mit Mosaik-MurM in resistenten *S. pneumoniae* Isolaten assoziiert werden (Filipe und Tomasz, 2000; Filipe *et al.*, 2001). Ein Bereich von 30 Aminosäuren (244-274), der

für die Spezifität der MurM katalysierten Reaktion verantwortlich ist, konnte identifiziert werden (Filipe *et al.*, 2001). Dabei scheint unter anderem die Anwesenheit von Lysin an Position 260 ausschlaggebend für den Einbau von Alanin als erste Aminosäure der Interpeptidbrücke zu sein während durch Threonin an Position 260 der Einbau von Serin bevorzugt wird (Filipe *et al.*, 2001; Lloyd *et al.*, 2008). Auch die drei in dieser Arbeit untersuchten Allele besitzen den relevanten Mosaikblock (s. Abbildung 4.2, graue Markierung) mit einer T260K-Substitution. Laut einer Einordnung von MurM Mosaikstrukturen von Filipe *et al.* (2000) entspricht *murM*<sub>Hu17</sub> dem Allel *murMB1*. Die größte Ähnlichkeit zu dem *murM*<sub>B6</sub> Gen zeigt das *murMB3* Allel mit einem Unterschied von 9 % in der Aminosäuresequenz. Mithilfe von Zellwandanalysen konnte für Stämme mit den Allelen *murMB1* und *murMB3* ein ungewöhnlich hoher Anteil an Alanin-Alanin-Interpeptidbrücken festgestellt werden (Severin und Tomasz, 1996; Filipe *et al.*, 2000; Filipe *et al.*, 2001). Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *murM* Allele könnte dies durch eine Zellwandanalyse verifiziert werden. Die leicht geringere Cefotaxim- aber deutlich höhere Penicillin-MHK, die durch MurM<sub>Hu17</sub> im Gegensatz zu den MurM Allelen mit *S. mitis* B6-Sequenz vermittelt wird, könnte mit der variablen Mosaikstruktur vor allem des N-Terminus (Aminosäure 1-175) in Zusammenhang stehen. Die Region zwischen Aminosäure 42 und 131 wurde bereits von Smith und Klugman (2001) mit Resistenzentwicklung assoziiert, da dieser Sequenzabschnitt immer in Transformanten vorhanden war, die mit *murM* DNA eines resistenten *S. pneumoniae* Stammes erhalten worden waren. Zur Klärung einer potentiellen Resistenzrelevanz des N-Terminus von MurM<sub>Hu17</sub> müssten gezielt die diversen Mosaikbereiche kloniert und deren Einfluss auf die MHK untersucht werden. Versuche mit gerichteter Mutagenese der drei unveränderten Aminosäuren (82-88) in MurM<sub>CCCB</sub> könnten Aufschluss über deren Beitrag zur Cefotaximresistenz geben, da das komplette MurM aus B6 einen höheren Resistenzanstieg vermitteln kann. Es gibt bisher keine Hinweise auf eine mögliche Resistenzrelevanz der drei Aminosäuren, dennoch sind diese Positionen bei allen von Filipe *et al.* (2000) veröffentlichten MurM Allelen verändert.

Lloyd *et al.* (2008) wiesen eine erhöhte katalytische Enzymaktivität von MurM Varianten resistenter *S. pneumoniae* nach, unter anderem auch des sogenannten *murMB1* Allels (Filipe *et al.*, 2000), das identisch mit *murM*<sub>Hu17</sub> ist. Es liegt nahe zu

vermuten, dass auch die *murM* Allele aus CCCB und B6 diese Eigenschaft besitzen und dadurch Resistenz vermitteln. Dies müsste allerdings durch *in vitro* Aktivitätsmessungen gereinigter Proteine getestet werden.

Der genaue Mechanismus, welcher der MurM-vermittelten  $\beta$ -Lactamresistenz zugrunde liegt, ist noch unbekannt. Eine Hypothese ist, dass verglichen mit linearen Muropeptiden die verzweigten Muropeptide einerseits ein bevorzugtes Substrat der Mosaik-PBP darstellen (Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996; Severin *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997; Dessen *et al.*, 2001), und andererseits kompetitiver gegen  $\beta$ -Lactame sind (Filipe und Tomasz, 2000). Dessen *et al.* (2001) konnten eine offene Konformation eines Mosaik-PBP nachweisen, die ihren Ursprung unter anderem in der T338A-Mutation hat, welche sowohl in den meisten PBP2x klinischer Isolate als auch in der CCCB-Familie vorkommt. Diese Konformation könnte die Verwendung verzweigter Substrate begünstigen. Die Theorie, dass resistente und sensitive PBP *in vivo* unterschiedliche Substrate verwenden, wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass ein resistentes PBP2x *in vitro* eine geringere katalytische Aktivität und Affinität zu Analogen von Stammpeptiden im Vergleich zu PBP2x<sub>R6</sub> aufweist (Zhao *et al.*, 1997). Allerdings weisen Penicillin-resistente *S. pneumoniae* mit niedrig-affinen PBP und einem unveränderten MurM Zellwände mit einem geringen mit sensitiven Stämmen vergleichbaren Anteil an verzweigten Muropeptiden auf (Severin *et al.*, 1996). Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht alle niedrig-affinen PBP eine veränderte Substratspezifität aufweisen und zeigt zudem, dass diese resistenten PBP sowohl mit linearen als auch verzweigten Muropeptiden interagieren.

Eine andere Hypothese postuliert, dass die zusätzlichen Dipeptide der Interpeptidbrücke die Hydrophilität von Lipid II erhöhen. Dadurch könnte eine Ansammlung von Holin-ähnlichen Proteinen verhindert werden, die für die Initiierung der irreversiblen Effekte von Zellwandinhibitoren verantwortlich gemacht werden (Moreillon *et al.*, 1990; Filipe *et al.*, 2002). Aufgrund der Strukturanalogie von zwei Domänen eines computergestützten MurM-Modells und bakteriellen Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Expression von Multidrug-Transportern beteiligt sind, diskutierten Fiser *et al.* (2003) eine mögliche Rolle von MurM als Teil der bakteriellen Stressantwort während der Anwesenheit von Zellwandinhibitoren.

Die Deletionen sowohl von *murM* alleine als auch des kompletten Operons *murMN* resultierten in einem Zusammenbruch des Resistenzphänotyps von CCCO, obwohl dieser Stamm fünf niedrig-affine PBP aufweist (s. Abschnitt 4.2.1.1). Dies korreliert mit anderen Studien (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Dieser Effekt geht allerdings mit einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums beider Stämme einher, wohingegen der Austausch gegen die *murM* Allele keine Auswirkungen auf das Wachstum zeigte (s. Abschnitt 4.2.1.2). Bislang wurde keine Beeinträchtigung des Wachstums von *murM*-Deletionsderivaten beobachtet. Ein Resistenzverlust wurde auch in *S. aureus* mit der Reprimierung des *murM*-Homologen *fmhB* trotz Anwesenheit des niedrig-affinen PBP2' beschrieben (Rohrer *et al.*, 1999; Rohrer und Berger-Bachi, 2003), während in *E. faecalis* die Inaktivierung des *murN* die Resistenz beeinträchtigt (Bouhss *et al.*, 2002). Der Grund für den Resistenzzusammenbruch in *murM*-Deletionsderivaten ist bisher unklar. Denkbar wäre, dass durch die Abwesenheit verzweigter Muropeptide der möglicherweise bessere Konkurrent der  $\beta$ -Lactame fehlt (Filipe und Tomasz, 2000) und dies somit zu einer gesteigerten Inhibierung der Mosaik-PBP führen könnte. Es ist vorstellbar, dass die Funktion resistenter PBP mit geringerer katalytischer Aktivität (Zhao *et al.*, 1997) zusätzlich durch suboptimale Substrate in Form linearer Muropeptide weiter beeinträchtigt wird (Rohrer und Berger-Bachi, 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass MurN im Gegensatz zu MurM weder für die Resistenzentwicklung noch für die Aufrechterhaltung eines normalen Wachstums von Bedeutung ist. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass MurM aus resistenten und sensitiven Stämmen unterschiedliche enzymatische Aktivitäten besitzen (Lloyd *et al.*, 2008), während für die MurN-Enzyme kein signifikanter Unterschied ermittelt wurde (De Pascale *et al.*, 2008). Dies stimmt mit der Existenz von Mosaikstrukturen in *murM* überein, während *murN* eine geringe Variabilität aufweisen (Filipe *et al.*, 2001).

In vielen Studien wurde gezeigt, dass MurM zusätzlich zur PBP-vermittelten  $\beta$ -Lactamresistenz als Resistenzdeterminante fungiert (Filipe *et al.*, 2001; Smith und Klugman, 2001; Filipe *et al.*, 2002; Cafini *et al.*, 2006). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass dies auch in der CCCB-Transformantenfamilie der Fall ist (s. Abbildung 5.1): der Stamm CCCB weist im vierten Transformationsschritt

zusätzlich zu nieder-affinen Varianten aller fünf hmw PBP ein Mosaik-MurM auf, welches Resistenz vermittelt.

### 5.2.2 Die PBP2b-vermittelte $\beta$ -Lactamresistenz

Die Penicillin- und Piperacillin-MHK von CCCB konnte durch alleinige Transformation der *murM* Allele aus CCCB und B6 in CCCO nicht erreicht werden. Einen Anhaltspunkt auf die Identität einer weiteren Resistenzdeterminante lieferten Microarray-Analysen, die auf ein verändertes *recR* in CCCB hindeuteten (Sauerbier *et al.*, 2012; Manuskript in Vorbereitung). Eine Sequenzierung dieser Region in CCCO und CCCB zeigte, dass das benachbarte *pbp2b* in CCCB komplett gegen das homologe *S. mitis* B6 Gen ausgetauscht wurde, während in CCCO lediglich ein kleiner Bereich der Transpeptidase-Domäne (Aminosäure 383-489) verändert vorliegt (s. Abbildung 4.6). Tatsächlich vermittelt das Mosaik-PBP2b in Kombination mit dem bereits veränderten MurM in CCCO eine Penicillin- und Piperacillinresistenz (nicht gezeigt) entsprechend der MHK von CCCB (s. Abschnitt 4.2.2). In dieser Transformante sind in PBP2b zwei N-terminale Aminosäureänderungen (V54I und T56S) nicht vorhanden, diese sind also folglich nicht an der Resistenz beteiligt. Das ist auch nicht zu erwarten, da bisher keine resistenzrelevanten Mutationen außerhalb der Transpeptidase-Domäne beschrieben sind. PBP2b weist eine hohe Affinität zu Penicillinen auf, interagiert aber nicht mit Cefotaxim (Hakenbeck *et al.*, 1987). Dementsprechend wurde keine Änderung der Cefotaximresistenz (nicht gezeigt) durch das Mosaik-PBP2b vermittelt. Dies erklärt ebenfalls, warum das PBP2b<sub>B6</sub> erst in der vierten Transformationsstufe (CCCO und CCCB) mittels Penicillinen selektioniert werden konnte (Hakenbeck *et al.*, 1998), und bestätigt den Beitrag von PBP2b an hoher Penicillinresistenz (Barcus *et al.*, 1995; Coffey *et al.*, 1995; Smith und Klugman, 1995; Reichmann *et al.*, 1996; Smith und Klugman, 1998).

Mit der Übertragung der gesamten Transpeptidase-Domäne des PBP2b<sub>B6</sub> in CCCO *murM*<sub>CCCB</sub> wurde die Penicillin-MHK des hochresistenten CCCB erreicht. In den meisten resistenten klinischen Isolaten finden sich zwei resistenzrelevante Mutationen, T446A/S und E476G (Dowson *et al.*, 1993; Smith und Klugman, 1995; Ferroni und Berche, 2001; Nagai *et al.*, 2002; Nichol *et al.*, 2002; Sanbongi *et al.*, 2004), wobei die T446A-Substitution zu einer 60 %-igen Reduktion der Affinität von PBP2b zu Penicillin führt (Pagliero *et al.*, 2004). Beide Substitutionen finden sich in

den Mosaik-PBP2b von CCCO und CCCB, stehen also folglich nicht mit dem Resistenzunterschied dieser Transformanten in Zusammenhang. Dagegen gab es schon früh Hinweise auf die Bedeutung C-terminaler Mutationen (Dowson *et al.*, 1989), die oft in hoch Penicillin-resistenten Stämmen vorkommen (Ferroni und Berche, 2001; Du Plessis *et al.*, 2002; Pagliero *et al.*, 2004) und in PBP2b von CCCB und CCCO *murM pbp2b*<sub>CCCB</sub>, nicht aber CCCO, verändert sind. Dazu gehören Substitutionen in der Region 590-641, die mit einer hohen Amoxicillinresistenz assoziiert wurden (Du Plessis *et al.*, 2002; Kosowska *et al.*, 2004; Cafini *et al.*, 2006). *In vitro* Studien mit dem PBP2b resistenter klinischer Isolate zeigten, dass Mutationen im Bereich des KTG-Motivs zu einer 95-99 %-igen Reduktion der Affinität gegenüber Penicillin führten (Pagliero *et al.*, 2004). Die Substitutionen im C-Terminus (ab Aminosäure 592) dieser niedrig-affinen PBP2b sind identisch mit denen von PBP2b<sub>B6</sub>. Pagliero *et al.* (2004) diskutierten, dass vier der Substitutionen (A619G, N659K, G660N, S664A) möglicherweise durch Erhöhung der Flexibilität des  $\beta$ 3-Stranges und strukturelle Umgestaltung des aktiven Zentrums die  $\beta$ -Lactambindung beeinträchtigen. Tatsächlich konnte dies für die zwei Substitutionen A619G und D625G kürzlich anhand eines Vergleichs der Kristallstruktur eines sensitiven und resistenten PBP2b bestätigt werden (Contreras-Martel *et al.*, 2009). Die dreidimensionalen Strukturen beider PBP2b-Enzyme stützen die bereits erwähnte Hypothese, dass resistente PBP durch die erhöhte Flexibilität des aktiven Zentrums verzweigte Muropeptide als Substrat bevorzugen könnten (Contreras-Martel *et al.*, 2009).

### **5.3 Identifizierung neuer Resistenzdeterminanten – Deletionsderivate von spr0683 und spr1851**

Der Versuch durch Transformation des hochresistenten CCCB mit chromosomaler *S. mitis* B6 DNA und Selektion auf  $\beta$ -Lactamantibiotika weitere Resistenzdeterminanten zu übertragen gestaltete sich schwierig. Die sehr geringen Transformationseffizienzen lassen sich anhand der neu ermittelten MHK von *S. mitis* B6 erklären (s. Abschnitt 4.3.1). Diese weichen deutlich von den publizierten Daten ab (Hakenbeck *et al.*, 1998) und zeigen für Cefotaxim und Penicillin sogar geringere MHK-Werte im Vergleich zu CCCB (s. Tabelle 4.4). Erstaunlicherweise konnten dennoch resistenterere CCCB-Derivate mit Penicillin- (CCCB B2) bzw.

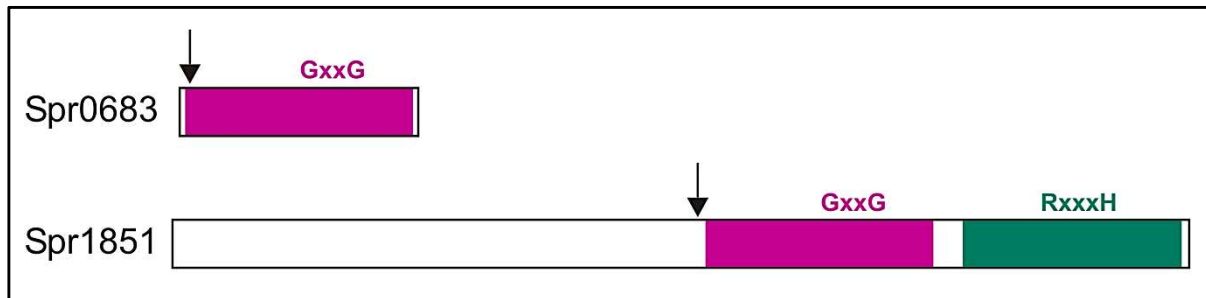
Oxacillinselektion (CCCB O6) erhalten werden, wenn auch in äußerst geringer Anzahl.

Ein genomischer Vergleich mithilfe einer DNA-Microarray-Analyse zeigte, dass der Stamm CCCB B2 statt eines Austausches gegen *S. mitis* B6 DNA eine teilweise Deletion des Gens spr0683 aufweist (s. Abschnitt 4.3.1.1). Es handelt sich bei CCCB B2 folglich um eine Mutante, die nicht mit einem Transformationsereignis in Verbindung gebracht werden kann. Diese Beobachtung ebenso wie die niedrigere Penicillin-MHK von *S. mitis* B6 verglichen mit CCCB deuten darauf hin, dass keine weiteren Penicillinresistenz-vermittelnden Determinanten in *S. mitis* B6 vorhanden sind und übertragen werden können.

In einem zweiten resistenteren CCCB-Derivat, CCCB O6, konnten mithilfe von DNA-Microarray-Analysen die benachbarten Gene spr1850 und spr1851 identifiziert werden, welche vermutlich gegen *S. mitis* B6-Sequenz ausgetauscht wurden. Eine gezielte Transformation dieser amplifizierten *S. mitis* B6-Homologe (smi\_0218 und smi\_0217) in CCCB brachte die Stämme CCCB smi0217/0218 #2 und #8 hervor. Diese Derivate zeigten eine Erhöhung der Resistenz gegen die drei getesteten  $\beta$ -Lactame, die in etwa der Resistenz von CCCB O6 entspricht (s. Abbildung 4.9). Eine Überprüfung der veränderten Sequenzen aus CCCB O6, CCCB smi0217/0218 #2 und #8 lieferte das überraschende Ergebnis, dass zwar in allen drei Stämmen Teile des Gens spr1851 gegen *S. mitis* B6-Sequenzen ausgetauscht wurden, eine Punktmutation oder ein Frameshift kurz nach der Rekombinationsstelle jedoch einen Abbruch der Proteinsynthese bewirken (s. Abbildung 4.8). Interessanterweise erfolgte die spr1851-Deletion entweder durch eine Punktmutation oder einen Frameshift bei Stämmen, welche zudem auf verschiedene Weise hergestellt wurden (Transformation mit chromosomaler DNA oder PCR-Produkt). Dies deutet nicht auf eine zufällige Mutation sondern eher auf einen gezielten Mechanismus zur Inaktivierung von spr1851 hin. Mittels Oxacillinselektion konnte DNA des etwas resistenteren *S. mitis* B6 auf CCCB übertragen werden, jedoch führte die Transformation zu einer Gen-Inaktivierung, welche scheinbar den Resistenzanstieg bewirkte. Diese Vermutung konnte durch den gezielten Austausch von spr1851 gegen das B6-Homolog smi\_0217, der keine Erhöhung der  $\beta$ -Lactamresistenz vermittelt, bestätigt werden (s. Abbildung 4.9).



Die Gene *spr0683* und *spr1851* kodieren für hypothetische Proteine, die beide eine KH-Domäne besitzen, wobei *Spr1851* zusätzlich eine R3H-Domäne aufweist (Abbildung 5.2). Beide Domänen finden sich häufig in Proteinen, die RNA- bzw. einzelsträngige Nukleinsäuren binden können (Siomi *et al.*, 1993; Grishin, 1998).



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung von Spr0683 und Spr1851**

Die hypothetischen Proteine sind mit ihren KH- (magenta) bzw. R3H-Domänen (grün) dargestellt. Die konservierten Motive (GxxG bzw. RxxxH) sind ebenfalls gezeigt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Stelle des Abbruchs der Proteinsynthese von Spr0683 in CCCB B2 bzw. Spr1851 in CCCB O6, CCCB smi0217/0218 #2 und #8.

### 5.3.1 Verbreitung der KH- und R3H-Domäne

Die „K homology“ (KH-) Domäne ist nach dem humanen Ribonukleoprotein K benannt (hnRNP K), in welchem sie zuerst identifiziert wurde (Siomi *et al.*, 1993), und zeichnet sich durch ein konserviertes Motiv aus, das aus Glycin, zwei variablen Aminosäuren und einem zweiten Glycin besteht (GxxG). Die R3H-Domäne wurde aufgrund des konservierten Motives benannt, das sich aus Arginin und Histidin, getrennt durch drei variable Aminosäuren (RxxxH), zusammensetzt. Beide Domänen sind sowohl in Eukaryoten und in Eubakterien, also auch Streptokokken, weit verbreitet. Während die KH-Domäne ebenfalls in vielen Proteinen von Archaeobakterien vertreten ist, konnte die R3H-Domäne bisher nicht in Archaeobakterien und *E. coli* detektiert werden (Siomi *et al.*, 1993; Grishin, 1998). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die R3H- (PF01424, Sanger Welcome Trust) und die KH-Domäne (PF07650, Sanger Welcome Trust) in 79 bzw. 81 Genomen der Gattung *Streptococcus* annotiert. Mittels Blast-Analysen von *spr0683* und *spr1851* konnten nur hypothetische Proteine gefunden werden, deren Funktion nicht bekannt ist.

Über die R3H-Domäne selbst ist wenig bekannt. Sie findet sich meist in Proteinen kombiniert mit Nukleinsäure-bindenden Domänen und könnte aufgrund dessen

ebenfalls in die Interaktion mit Nukleinsäuren involviert sein (Grishin, 1998). In JAG-homologen Proteinen, die in *B. subtilis* mit Proteinen für die Sporulation assoziiert sind, findet sich die R3H-Domäne oftmals C-terminal einer KH-Domäne (Grishin, 1998). Diese Organisation der beiden Domänen findet sich auch in Spr1851 (Abbildung 5.2). Anhand des 3D-Modells einer R3H-Domäne sind drei konservierte positiv geladene Aminosäuren eng gruppiert und könnten eine Interaktionsstelle mit Nukleinsäure bilden (Grishin, 1998; Liepinsh *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um Arginin und Histidin des konservierten Motivs und ein zweites Arginin/Lysin. Diese drei Aminosäuren der potentiellen Nukleinsäure-Interaktionsstelle finden sich auch in der R3H-Domäne von Spr1851 (R197, H201 und R321). Des Weiteren wurde eine hydrophobe Oberfläche der R3H-Domäne, die an einer möglichen Protein-Protein Interaktion beteiligt sein könnte, beschrieben (Liepinsh *et al.*, 2003). Es wurde diskutiert, dass die R3H-Domäne in Poly(A)-Bindung (Wu *et al.*, 2005) bzw. Bindung einzelsträngiger DNA (Fukita *et al.*, 1993; Liepinsh *et al.*, 2003) involviert sein könnte. Die KH-Domäne ist weitaus besser charakterisiert als die R3H-Domäne. Sie findet sich in einer Vielzahl von Proteinen, die eine sehr große Bandbreite von Funktionen abdecken (Adinolfi *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2008). KH-Domänen lassen sich anhand ihrer Topologie in zwei Unterfamilien einteilen (Grishin, 2001), wobei Typ I-Domänen gewöhnlich in Eukaryoten und Typ II-Domänen in Prokaryoten vorkommen (Valverde *et al.*, 2008). Die KH-Motive finden sich häufig in multiplen Kopien in einem Protein (Burd und Dreyfuss, 1994; Adinolfi *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2008), wodurch dem Protein vermutlich eine höhere Spezifität und Affinität für die Nukleinsäurebindung verliehen wird (Adinolfi *et al.*, 1999; Beuth *et al.*, 2005; Lunde *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2008). Prokaryotische Typ II KH-Domänen finden sich allerdings typischerweise einzeln (Valverde *et al.*, 2008). KH-Domänen erkennen vermutlich spezifische Zielsequenzen und vermitteln wahrscheinlich eine eher schwache Bindung von Nukleinsäuren, vor allem im Falle von einzeln auftretenden KH-Domänen (Dejgaard und Leffers, 1996; Adinolfi *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2008). Valverde *et al.* (2008) beschreiben ein repräsentatives Set an Proteinen mit KH-Domänen, unter anderem auch einige NMR- und Kristallstrukturen mit komplexierten Nukleinsäuren. Anhand solcher Strukturen und mithilfe von *in vitro* Analysen konnte für eine Vielzahl diverser Proteine gezeigt werden, dass deren KH-Domänen sowohl RNA als auch einzel- und seltener doppelsträngige DNA binden können (u. a. Valverde *et al.*, 2008; Dejgaard und Leffers, 1996). Dabei gehen KH-

Domänen eine Bindung mit vier Nukleotiden in einer Spalte zwischen zwei  $\alpha$ -Helices und einem Loop mit dem konservierten GxxG-Motiv ein (Valverde *et al.*, 2008). Die Relevanz der konservierten Region einschließlich des GxxG-Motivs für die Bindung von Nukleinsäuren wurde früh erkannt. Bereits eine Punktmutation in unmittelbarer Nähe des zweiten Glycins einer KH-Domäne beeinträchtigt die RNA-Bindung des humanen Proteins FMR1. Diese Mutation ist mit einem Krankheitsbild assoziiert und kann zu einer schweren mentalen Beeinträchtigung führen (De Boulle *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993). Eine Protein-Protein Interaktion, welche scheinbar ebenfalls durch die Bindung der KH-Domänen vermittelt wird, konnte für einige Proteine gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997). Exponierte hydrophobe Aminosäuren könnten eine Position für diese Protein-Protein Interaktion darstellen (Musco *et al.*, 1996). Auch die KH-Domänen von Spr0683 und Spr1851 zeichnen sich durch eine Vielzahl hydrophober Aminosäuren aus, welche das GxxG-Motiv umgeben. Dies könnte für eine ähnliche funktionelle Rolle sprechen.

Die hohe Variabilität der wenigen ermittelten Zielsequenzen von Nukleinsäuren korreliert mit den unzähligen, wenn überhaupt, bekannten Funktionen von Proteinen mit KH-Domäne. Die einzige Gemeinsamkeit dieser Proteine ist eine hypothetische bzw. nachgewiesene Bindung von Nukleinsäuren, die möglicherweise durch die KH-Domäne vermittelt wird.

### **5.3.2 Die phänotypischen Auswirkungen der Deletionen von spr0683 und spr1851**

Wie in Abschnitt 5.3 erläutert führt der Verlust der Gene spr0683 und spr1851 zu einem Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz. Um auszuschließen, dass dieser Phänotyp durch andere genomische Veränderungen vermittelt wird, wurden beide Gene sowohl im R6- als auch im CCCB-Hintergrund gezielt inaktiviert.

Tatsächlich vermittelte die Inaktivierung der jeweiligen Gene in CCCB einen Anstieg der Resistenz annähernd auf das Niveau von CCCB B2 und CCCB O6 für Cefotaxim, Penicillin und Piperacillin (s. Tabelle 4.5 und Abbildung 4.10). Allerdings wurde die Oxacillin-MHK von CCCB B2 und CCCB O6 nicht erreicht. In diesen Mutanten scheinen zusätzlich zur Inaktivierung von spr0683 und spr1851 weitere Faktoren einen Einfluss auf die Oxacillinresistenz zu vermitteln. Diese können durch genomische Hybridisierungsexperimente nicht notwendigerweise nachgewiesen

werden. Nur in CCCB O6 wurde mithilfe der DNA-Microarray-Analyse ein möglicherweise veränderter intergener Bereich identifiziert, der aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert wurde. Während des Transformationsereignisses wurde das benachbarte Gen von spr1851, spr1850, sowohl in CCCB O6 als auch in der Transformante CCCB smi0217/0218 #2 komplett gegen das *S. mitis* B6 Homolog smi\_0218 ausgetauscht. Der Stamm CCCB smi0217/0218 #8 zeigte einen Austausch dieses Gens von Basenpaar 1 bis 345. Die identische Oxacillin-MHK dieser drei Stämme (s. Abbildung 4.9) könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese ausgetauschte *S. mitis* B6-Sequenz zusätzlich zur Inaktivierung von spr1851 einen Einfluss auf die Oxacillinresistenz vermittelt. Dies müsste ebenfalls anhand einer gezielten Transformation des *S. mitis* B6 Gens mit anschließender MHK-Bestimmung festgestellt werden. Die Inaktivierung von spr0683 und spr1851 führten auch im sensitiven R6-Hintergrund ohne den Einfluss anderer Resistenzdeterminanten zu einem Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz. Dabei war der Grad der Resistenzerrhöhung aufgrund der Deletionen in beiden genetischen Hintergründen recht ähnlich und zeigte den größten (2,5-fachen) Resistenzanstieg gegen Piperacillin. Lediglich die Deletion von spr1851 im Wildtyp R6 führte zu keinem Resistenzanstieg für Oxacillin und Penicillin. Diese Beobachtung ist bei derzeitigem Kenntnisstand schwierig zu interpretieren und kann ohne weitere Untersuchungen zur möglichen Funktion von spr1851 nicht geklärt werden. Da es sich bei beiden Genprodukten um hypothetische möglicherweise Nukleinsäure-bindende Proteine mit KH-Domäne handelt, sollte eine Inaktivierung beider Gene zusammen in R6 und CCCB über einen möglichen kompensatorischen Effekt Aufschluss geben. Es wäre vorstellbar, dass die Deletion eines der beiden Gene durch die Anwesenheit des anderen kompensiert wird. Die Kombination der Deletionen hatte weder einen Verlust des Resistenzphänotyps noch eine vorstellbare Aufsummierung der Resistenzeffekte zur Folge. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass beide Proteine eine ähnliche Aufgabe erfüllen bzw. ein ähnliches Ziel besitzen. Jedoch müssten weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Funktion der Proteine durchgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung von spr0683 oder spr1851 unabhängig von dem ursprünglichen Selektionsantibiotikum Resistenz gegen mehrere  $\beta$ -Lactame vermittelt. In diesem Zusammenhang lieferten Blast-Analysen ein erstaunliches Ergebnis. Das spr0683 Homolog des resistenten klinischen Isolats *S. pneumoniae* PS184 liegt ebenfalls teilweise deletiert vor. Dies führt wie auch bei

CCCB B2 zu einem Verlust der KH-Domäne. Interessanterweise zeigte dieser Stamm auch eine Beeinträchtigung des Wachstums (nicht gezeigt). Die Frage, ob die Inaktivierung von spr0683 möglicherweise eine Relevanz in klinischen Isolaten hat, lässt sich allerdings nur durch eine gezielte Deletion dieses Gens und die Untersuchung der daraus resultierenden phänotypischen Auswirkungen klären.

Der beobachtete Wachstumsdefekt der Deletionsderivate sowohl im R6- als auch im CCCB-Hintergrund (s. Abschnitt 4.3.2.2) lässt sich, wie auch die Resistenzentwicklung, nicht ohne weitere Hinweise auf die Funktion von spr0683 und spr1851 erklären. Die Beeinträchtigung des Wachstums wurde durch die Deletion beider Gene zusammen wie auch einzeln vermittelt. Der Verlust beider Proteine vermittelt scheinbar einen generellen Effekt, der offensichtlich schwere physiologische Folgen hat.

Nukleinsäure-bindende Domänen finden sich oftmals in Kombination mit enzymatischen Domänen, die die Ziele des Enzyms bestimmen und die katalytische Aktivität regulieren (Lunde *et al.*, 2007). Sowohl die KH- als auch die R3H-Domäne selbst besitzen keine enzymatische Aktivität. Zudem konnten mithilfe von Blast-Analysen keine weiteren Domänen mit katalytischer Funktion in den hypothetischen Proteinen Spr0683 und Spr1851 gefunden werden. Aufgrund dessen ist es sehr schwierig alleine durch die anwesenden KH- und R3H-Domänen Rückschlüsse auf die Funktionen von Spr0683 und Spr1851 und damit einhergehend auf die beobachteten Phänotypen der Deletionsderivate zu ziehen. Für die KH-Domäne wurde gezeigt, dass sie Protein-Interaktionen vermitteln kann (Zhang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997). Aufgrund dessen ist vorstellbar, dass Spr0683 und Spr1851 mit anderen Proteinen interagieren, die wiederum eine enzymatische Funktion erfüllen und somit indirekt die beobachteten Phänotypen hervorrufen. Dabei könnte durch das Fehlen der Proteine die Stabilität oder die katalytische Aktivität eines anderen Proteins beeinflusst werden bzw. eine Protein-Protein Interaktion nicht mehr oder vermehrt stattfinden. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass Aminosäuresubstitutionen in den KH-Domänen von zwei bakteriellen Proteinen, PNPase und NusA, zu einer modifizierten Interaktion mit anderen Proteinen führen (Garcia-Mena *et al.*, 1999; Worbs *et al.*, 2001).

Andererseits wurde postuliert, dass die primäre Funktion der KH-Domäne möglicherweise die spezifische Erkennung der Nukleinsäure ist (Adinolfi *et al.*, 1999). Es wurde diskutiert, dass Proteine mit KH-Domäne offenbar eine wichtige Rolle bei der Regulierung des zellulären RNA Metabolismus einnehmen (Adinolfi *et al.*, 1999). Zudem finden sich KH-Domänen in Proteinen, die mit der transkriptionellen und translationellen Regulation assoziiert sind (Valverde *et al.*, 2008). Es ist vorstellbar, dass die Anwesenheit von Spr0683 und Spr1851 eine potentielle Ziel-mRNA stabilisieren könnte, indem die Proteine über die KH- bzw. R3H-Domäne eine Bindung mit der RNA eingehen und diese somit vor Degradierung geschützt ist. Generell wäre sowohl eine Stabilisierung als auch eine Degradierung von mRNA denkbar, da sich die Domänen in Proteinen finden, die an diesen beiden Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem das eukaryotische Protein PCBP bzw. die PNPase aus *E. coli* (Valverde *et al.*, 2008; Garcia-Mena *et al.*, 1999). Dementsprechend könnten die Domänen durch ihre mögliche RNA-bindende Eigenschaft in beide Prozesse involviert sein. Jedoch müssen zukünftige Untersuchungen noch viele offene Fragen hinsichtlich der potentiellen Funktion der beiden Proteine klären.

Transkriptionsanalysen der Deletionsderivate R6  $\Delta$ spr0683 und R6 spr1851::*janus* dienten als Screening-Methode um Hinweise hinsichtlich einer denkbaren Beeinflussung der Genexpression durch die hypothetischen Proteine zu erhalten (s. Abschnitt 4.3.2.3). Während das Transkriptionsprofil des spr0683-Deletionsderivats nur elf Gene mit veränderter Transkriptmenge aufwies (s. Abbildung 4.13), konnten 32 Gene mit unterschiedlicher Expression im spr1851-Deletionsderivat detektiert werden (Abbildung 4.14). Dabei gehört mit 14 Genen fast die Hälfte der differentiell exprimierten Gene zum Kompetenzregulon. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die untersuchten Bakterienzellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme in unterschiedlichen Kompetenzphasen befanden. Die mögliche Zahl an falsch-positiven Genen könnte durch eine Wiederholung der Transkriptionsanalyse des spr1851-Deletionsderivats in C-Medium mit niedrigem pH-Wert (pH 6,8) reduziert werden, da die Kompetenzentwicklung von *S. pneumoniae* pH-abhängig ist (Tomasz und Mosser, 1966; Chen und Morrison, 1987).

Wie bereits erwähnt führte der sehr effiziente Promotor der Januskassette, welche im Deletionsderivat R6 spr1851::*janus* anstelle von spr1851 integriert wurde, zu einer 56-fach gesteigerten Genexpression des downstream-gelegenen spr1850. Aus

diesem Grund können die beobachteten Veränderungen des Transkriptionsprofils nicht alleine mit dem Fehlen von *spr1851* assoziiert werden. Vor diesem Hintergrund wurde die Inaktivierung von *spr1851* durch die Integration eines *spr1851*-Minigens anstelle der Januskassette generiert (R6  $\Delta$ *spr1851*; s. Abschnitt 3.26.4) und dieser Stamm für die phänotypische Charakterisierung verwendet. Eine Transkriptionsanalyse dieses neuen Deletionsderivats würde die Auswirkungen des alleinigen Fehlens von *spr1851* zeigen.

Die ermittelten Transkriptionsprofile beider Deletionsderivate weisen generell eine Mehrzahl an hypothetischen Genen auf, deren Funktion nicht bekannt ist. Ein potentieller Beitrag dieser Gene bzw. deren Produkte zur Resistenz kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dennoch müsste eine mögliche Resistenzrelevanz mithilfe gezielter Transformationsexperimente einzelner Gene überprüft werden. Interessanterweise kodieren die hypothetischen Gene *spr0709* und *spr1875* für Proteine mit einer vermeintlichen LysM-Domäne, die möglicherweise eine Peptidoglykanbindende Funktion verleiht und sich in einer Vielzahl von Enzymen befindet, welche im Zellwandabbau involviert sind (Buist *et al.*, 2008). Eine mögliche Resistenzrelevanz dieser Proteine erfordert weitere Untersuchungen.

Lediglich das Gen *clpL*, welches in den Deletionsderivaten sechs- (R6  $\Delta$ *spr0683*) bis zwölffach (R6 *spr1851::janus*) höher transkribiert wurde, konnte bereits mit Resistenz assoziiert werden (Tran *et al.*, 2011) und könnte aufgrund dessen mit den Resistenzphänotypen der Deletionsderivate in Zusammenhang stehen.

### **5.3.3 Die Phänotypen der Deletionsderivate – welche Rolle spielt ClpL?**

ClpL, die ATP-bindende Untereinheit einer ATP-abhängigen Protease, gehört zur Clp/HSP100-Proteinfamilie und wird bei Stress induziert (Choi *et al.*, 1999). ClpL vermittelt vermutlich eher die Faltung als die Degradierung von Proteinen (Bjørnstad und Håvarstein, 2011). Erst kürzlich zeigten Tran *et al.* (2011), dass Stämme mit überexprimiertem ClpL eine erhöhte Penicillinresistenz sowie eine verlängerte Generationszeit aufweisen. Solche phänotypischen Auswirkungen konnten auch bei den *spr0683*- und *spr1851*-Deletionsderivaten festgestellt werden und könnten möglicherweise auf die erhöhte Transkriptmenge von *clpL* zurückzuführen sein. Daher wurden *clpL* Inaktivierungen in den *spr0683*- bzw. *spr1851*-Deletionsderivaten

generiert und analysiert. Zunächst konnte anhand eines Western Blots gezeigt werden, dass nicht nur die Transkriptmenge erhöht sondern auch die Proteinmenge von ClpL sowohl in den R6- als auch in den CCCB-Deletionsderivaten größer ist (s. Abschnitt 4.3.3.1). Die sechs- bis zwölffach erhöhte Transkriptmenge von *clpL* korreliert allerdings nicht mit der ermittelten Proteinmenge. Eine Inaktivierung von *clpL* führte zu keiner Veränderung der Resistenz in den spr0683- und spr1851-Deletionsderivaten, d. h. ClpL ist nicht mittelbar an der Resistenz beteiligt (s. Abschnitt 4.3.3.2). Weiterhin führte das Fehlen von *clpL* lediglich zu einer minimalen Veränderung der Generationszeit von zwei untersuchten Stämmen, ist also nicht an dem erheblichen Wachstumsdefekt der spr0683- und spr1851-Deletionsderivate beteiligt. Tran *et al.* (2011) wiesen nach, dass eine induzierte ClpL-Überexpression in einer gesteigerten PBP2x-Menge resultierte und beide Proteine nach einem Hitzeschock miteinander interagieren. Die daraufhin untersuchte PBP2x-Menge in den spr0683- und spr1851-Deletionsderivaten (s. Abschnitt 4.3.3.3) zeigte jedoch keine detektierbaren Unterschiede. Die Resistenzphänotypen der Deletionsderivate werden folglich weder durch die ClpL-Erhöhung noch eine indirekt vermittelte PBP2x-Erhöhung beeinflusst.

## 5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnten MurM und PBP2b aus *S. mitis* B6 als Ursache für den Resistenzunterschied von CCCO und CCCB, zwei hochresistenten *S. pneumoniae* R6 Transformanten, identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass diverse Mosaik-MurM einen Anstieg der  $\beta$ -Lactamresistenz vermitteln. Dabei bewirken bereits drei unterschiedliche Aminosäuren in MurM<sub>B6</sub> im Vergleich zu MurM<sub>CCCB</sub> einen weiteren Resistenzanstieg. Eine gerichtete Mutagenese könnte die Rolle dieser drei Aminosäuren bei der Resistenzentwicklung herausstellen. Interessant wäre auch die Klonierung diverser Mosaikbereiche, die alleine der N-Terminus von MurM<sub>Hu17</sub> aufweist, um deren Rolle bei der  $\beta$ -Lactamresistenz zu ermitteln. Zur Verifizierung eines tatsächlich erhöhten Anteils verzweigter Muropeptide, wie es für verschiedene Mosaik-MurM bereits beschrieben wurde (Filipe und Tomasz, 2000; Filipe *et al.*, 2001), könnten Zellwandanalysen dienen. Eine der denkbaren Folgen, die mit einer erhöhten Anzahl verzweigter



Muropeptide einhergehen könnte, wäre die Rolle als bevorzugtes Substrat von Mosaik-PBP (Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996; Severin *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997; Dessen *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang könnten durch vergleichbare *in vitro* Experimente, wie sie von Zhao *et al.* (1997) durchgeführt wurden, die katalytische Aktivität der Mosaik-PBP aus CCCB für lineare und verzweigte Muropeptide (Lipid II-Ala oder Lipid II-Ser; De Pascale *et al.*, 2008) ermittelt werden und somit Aufschluss über eine potentielle Substratspezifität geben.

Weiterhin wäre interessant, ob zusätzliche bisher unbekannte Resistenzdeterminanten von *S. mitis* B6 auf CCCB übertragen wurden. Die kürzlich erfolgte Sequenzierung des CCCB-Genoms hat gezeigt, dass *murE*, eine neu identifizierte Resistenzdeterminante (Todorova, 2010), in CCCB verändert vorliegt. Gezielte Klonierungen und eine anschließende MHK-Bestimmung könnten Aufschluss darüber geben, ob MurE<sub>B6</sub> an der Resistenz von CCCB beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurden die phänotypischen Auswirkungen der Deletionsderivate von spr0683 und spr1851 untersucht. Beide Gene kodieren für hypothetische Proteine, deren Funktion zwar nicht bekannt ist, die jedoch mit putativen Nukleinsäurebindende Domänen ein gemeinsames Merkmal besitzen. Zur Untersuchung einer möglichen Bindung der Proteine an Nukleinsäure wurden GST-Fusionsproteine im Zuge dieser Arbeit hergestellt (nicht gezeigt). Ein erster Vorversuch mithilfe eines Bandshift Assays (EMSA) zeigte, dass diese Methode nicht als Screening für eine vermeintliche generelle Nukleinsäurebindende Eigenschaft der Proteine geeignet ist (nicht gezeigt). Diese Methode könnte eher hilfreich sein um die Bindung kurzer Nukleinsäure-Fragmente mit spezifischer Sequenz zu analysieren. Eine Filterbindungsstudie bzw. ein Northwestern Blot, wie von Matunis *et al.* (1992) und Dejgaard *et al.* (1996) für KH-Domänen Proteine beschrieben, scheinen besser geeignet für die Untersuchung einer generellen Nukleinsäurebindenden Funktion von Spr0683 und Spr1851. Zur Identifizierung einer spezifischen Nukleinsäurebindung könnten die Proteine mithilfe eines Tags an einer Säule immobilisiert werden, gefolgt von einer Inkubation mit RNA und anschließender Analyse der gebundenen RNA mittels einer Sequenzierung.

---

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Resistenzphänotyp mit Deletionen in den Genen *spr0683* und *spr1851* nachgewiesen. In beiden Mutanten konnte unter anderem eine erhöhte Transkriptmenge der zwei Gene *spr0709* und *spr1875* festgestellt werden. Beide Gene kodieren für hypothetische Proteine mit einer vermeintlichen LysM-Domäne, welche sich in Enzymen befindet, die mit dem Zellwand-Metabolismus assoziiert werden können (Buist *et al.*, 2008). Diese Proteine wären interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen im Zusammenhang mit der  $\beta$ -Lactamresistenz der Deletionsderivate.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adinolfi S., Bagni C., Castiglione Morelli M. A., Fraternali F., Musco G., Pastore A.** (1999). Novel RNA-binding motif: the KH module. *Biopolymers*. **51 (2)**: 153-164.

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

**Appelbaum P. C.** (1987). World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol.* **6 (4)**: 367-377.

**Avery O. T., Macleod C. M., McCarty M.** (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* **79 (2)**: 137-158.

**Barcus V. A., Ghanekar K., Yeo M., Coffey T. J., Dowson C. G.** (1995). Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* **126 (3)**: 299-303.

**Beuth B., Pennell S., Arnvig K. B., Martin S. R., Taylor I. A.** (2005). Structure of a *Mycobacterium tuberculosis* NusA-RNA complex. *Embo J.* **24 (20)**: 3576-3587.

**Biørnstad T. J. and Håvarstein L. S.** (2011). ClpC acts as a negative regulator of competence in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology.* **157 (Pt 6)**: 1676-1684.

**Bouhss A., Josseaume N., Severin A., Tabei K., Hugonnet J. E., Shlaes D., Mengin-Lecreulx D., Van Heijenoort J., Arthur M.** (2002). Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J Biol Chem.* **277 (48)**: 45935-45941.

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

**Buist G., Steen A., Kok J., Kuipers O. P.** (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol.* **68 (4)**: 838-847.

**Burd C. G. and Dreyfuss G.** (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science.* **265 (5172)**: 615-621.

**Cafini F., Del Campo R., Alou L., Sevillano D., Morosini M. I., Baquero F., Prieto J.** (2006). Alterations of the penicillin-binding proteins and *murM* alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **57 (2)**: 224-229.

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

- Carratalá J., Alcaide F., Fernández-Sevilla A., Corbella X., Liñares J., Gudiol F.** (1995). Bacteremia due to viridans streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* **20 (5)**: 1169-1173.
- Chalkley L., Schuster C., Potgieter E., Hakenbeck R.** (1991). Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett.* **69 (1)**: 35-42.
- Chalkley L. J. and Koornhof H. J.** (1990). Intra- and inter-specific transformation of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.* **26 (1)**: 21-28.
- Chen J. D. and Morrison D. A.** (1987). Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol.* **133 (7)**: 1959-1967.
- Chen T., Damaj B. B., Herrera C., Lasko P., Richard S.** (1997). Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol.* **17 (10)**: 5707-5718.
- Chesnel L., Pernot L., Lemaire D., Champelovier D., Croize J., Dideberg O., Vernet T., Zapun A.** (2003). The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J Biol Chem.* **278 (45)**: 44448-44456.
- Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M., Hakenbeck R.** (2007). Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol.* **297 (7-8)**: 503-512.
- Choi I. H., Shim J. H., Kim S. W., Kim S. N., Pyo S. N., Rhee D. K.** (1999). Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Immunol.* **43 (8)**: 807-812.
- Claverys J. P. and Håvarstein L. S.** (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol.* **5 (3)**: 219-229.
- Coffey T. J., Daniels M., Mcdougal L. K., Dowson C. G., Tenover F. C., Spratt B. G.** (1995). Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **39 (6)**: 1306-1313.
- Coffey T. J., Dowson C. G., Daniels M., Spratt B. G.** (1993). Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol Lett.* **110 (3)**: 335-339.
- Coffey T. J., Dowson C. G., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B. G., Musser J. M.** (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5 (9)**: 2255-2260.
- Contreras-Martel C., Dahout-Gonzalez C., Martins Ados S., Kotnik M., Dessen A.** (2009). PBP active site flexibility as the key mechanism for beta-lactam resistance in pneumococci. *J Mol Biol.* **387 (4)**: 899-909.

- Contreras-Martel C., Job V., Di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O., Dessen A.** (2006). Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol.* **355 (4)**: 684-696.
- Dagkessamanskaia A., Moscoso M., Henard V., Guiral S., Overweg K., Reuter M., Martin B., Wells J., Claverys J. P.** (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol.* **51 (4)**: 1071-1086.
- De Boule K., Verkerk A. J., Reyniers E., Vits L., Hendrickx J., Van Roy B., Van Den Bos F., De Graaff E., Oostra B. A., Willems P. J.** (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* **3 (1)**: 31-35.
- De Pascale G., Lloyd A. J., Schouten J. A., Gilbey A. M., Roper D. I., Dowson C. G., Bugg T. D.** (2008). Kinetic characterization of lipid II-Ala:alanyl-tRNA ligase (MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using semisynthetic aminoacyl-lipid II substrates. *J Biol Chem.* **283 (50)**: 34571-34579.
- De Saizieu A., Gardes C., Flint N., Wagner C., Kamber M., Mitchell T. J., Keck W., Amrein K. E., Lange R.** (2000). Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol.* **182 (17)**: 4696-4703.
- Dejgaard K. and Leffers H.** (1996). Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur J Biochem.* **241 (2)**: 425-431.
- Denapate D., Brückner R., Nuhn M., Reichmann P., Henrich B., Maurer P., Schähle Y., Selbmann P., Zimmermann W., Wambutt R., Hakenbeck R.** (2010). The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? *PLoS One.* **5 (2)**: e9426.
- Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J., Dideberg O.** (2001). Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J Biol Chem.* **276 (48)**: 45106-45112.
- Dowson C. G., Coffey T. J., Kell C., Whiley R. A.** (1993). Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **9 (3)**: 635-643.
- Dowson C. G., Hutchison A., Brannigan J. A., George R. C., Hansman D., Liñares J., Tomasz A., Smith J. M., Spratt B. G.** (1989). Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86 (22)**: 8842-8846.
- Dowson C. G., Hutchison A., Woodford N., Johnson A. P., George R. C., Spratt B. G.** (1990). Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87 (15)**: 5858-5862.

- Du Plessis M., Bingen E., Klugman K. P.** (2002). Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* **46 (8)**: 2349-2357.
- Du Plessis M., Smith A. M., Klugman K. P.** (2000). Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **6 (2)**: 127-131.
- Ferroni A. and Berche P.** (2001). Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children. *J Med Microbiol.* **50 (9)**: 828-832.
- Filipe S. R., Severina E., Tomasz A.** (2000). Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **182 (23)**: 6798-6805.
- Filipe S. R., Severina E., Tomasz A.** (2001). Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides. *J Biol Chem.* **276 (43)**: 39618-39628.
- Filipe S. R., Severina E., Tomasz A.** (2002). The *murMN* operon: a functional link between antibiotic resistance and antibiotic tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99 (3)**: 1550-1555.
- Filipe S. R. and Tomasz A.** (2000). Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97 (9)**: 4891-4896.
- Fiser A., Filipe S. R., Tomasz A.** (2003). Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.* **11 (12)**: 547-553.
- Frohnweiler K.** (2009). Überexpression und Reinigung von MurM und Untersuchung seiner Rolle bei der Vermittlung von beta Lactam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Fukita Y., Mizuta T. R., Shirozu M., Ozawa K., Shimizu A., Honjo T.** (1993). The human Subp-2, a DNA-binding protein specific to the single-stranded guanine-rich sequence related to the immunoglobulin  $\mu$  chain switch region. *J Biol Chem.* **268 (23)**: 17463-17470.
- Garcia-Bustos J. and Tomasz A.** (1990). A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87 (14)**: 5415-5419.
- Garcia-Bustos J. F., Chait B. T., Tomasz A.** (1987). Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem.* **262 (32)**: 15400-15405.
- Garcia-Bustos J. F., Chait B. T., Tomasz A.** (1988). Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol.* **170 (5)**: 2143-2147.

- Garcia-Mena J., Das A., Sanchez-Trujillo A., Portier C., Montanez C.** (1999). A novel mutation in the KH domain of polynucleotide phosphorylase affects autoregulation and mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **33 (2)**: 235-248.
- Ghuysen J. M.** (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* **45** 37-67.
- Goffin C. and Ghuysen J. M.** (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62 (4)**: 1079-1093.
- Gordon E., Mouz N., Duee E., Dideberg O.** (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol.* **299 (2)**: 477-485.
- Grebe T. and Hakenbeck R.** (1996). Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **40 (4)**: 829-834.
- Grebe T., Paik J., Hakenbeck R.** (1997). A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol.* **179 (10)**: 3342-3349.
- Griffith F.** (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond).* **27 (2)**: 113-159.
- Grishin N. V.** (1998). The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids. *Trends Biochem Sci.* **23 (9)**: 329-330.
- Grishin N. V.** (2001). KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res.* **29 (3)**: 638-643.
- Guenzi E., Gasc A. M., Sicard M. A., Hakenbeck R.** (1994). A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **12 (3)**: 505-515.
- Hakenbeck R.** (1998). Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* - Evolution und Verbreitung. *Chemo J.* **7 (2)**: 43-49.
- Hakenbeck R., Balmelle N., Weber B., Gardes C., Keck W., De Saizieu A.** (2001). Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **69 (4)**: 2477-2486.
- Hakenbeck R., Briese T., Ellerbrok H.** (1986). Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem.* **157 (1)**: 101-106.
- Hakenbeck R., Grebe T., Zähler D., Stock J. B.** (1999). Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol.* **33 (4)**: 673-678.
- Hakenbeck R., König A., Kern I., Van Der Linden M., Keck W., Billot-Klein D., Legrand R., Schoot B., Gutmann L.** (1998). Acquisition of five high- $M_r$  penicillin-

binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. **180 (7)**: 1831-1840.

**Hakenbeck R., Martin C., Dowson C., Grebe T.** (1994). Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. J Bacteriol. **176 (17)**: 5574-5577.

**Hakenbeck R., Tornette S., Adkinson N. F.** (1987). Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. J Gen Microbiol. **133 (3)**: 755-760.

**Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. **166 (4)**: 557-580.

**Hannan S., Ready D., Jasni A. S., Rogers M., Pratten J., Roberts A. P.** (2010). Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. **59 (3)**: 345-349.

**Hansman D., Devitt L., Miles H., Riley I.** (1974). Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. Med J Aust. **2 (10)**: 353-356.

**Hardie J. M. and Whiley R. A.** (1995). The genus *Streptococcus*. In: The genera of lactic acid bacteria. (Hrsg. B.J.B. Wood, W.H. Holzapel). Blackie Academic and Professional. **2** 55-124.

**Håvarstein L. S., Coomaraswamy G., Morrison D. A.** (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A. **92 (24)**: 11140-11144.

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

**Henrichsen J.** (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. **33 (10)**: 2759-2762.

**Hoskins J., Matsushima P., Mullen D. L., Tang J., Zhao G., Meier T. I., Nicas T. I., Jaskunas S. R.** (1999). Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. **181 (20)**: 6552-6555.

**Jacobs M. R., Koornhof H. J., Robins-Browne R. M., Stevenson C. M., Vermaak Z. A., Freiman I., Miller G. B., Witcomb M. A., Isaacson M., Ward J. I., Austrian R.** (1978). Emergence of multiply resistant pneumococci. N Engl J Med. **299 (14)**: 735-740.

**Jedrzejewski M. J.** (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev. **65 (2)**: 187-207.

**Kawamura Y., Hou X. G., Sultana F., Miura H., Ezaki T.** (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol. **45 (2)**: 406-408.



- Kell C. M., Sharma U. K., Dowson C. G., Town C., Balganesh T. S., Spratt B. G.** (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett. **106 (2)**: 171-175.
- Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., Havarstein L. S., Bek-Thomsen M., Tettelin H., Sorensen U. B.** (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. PLoS One. **3 (7)**: e2683.
- Kislak J. W., Razavi L. M., Daly A. K., Finland M.** (1965). Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. Am J Med Sci. **250 (3)**: 261-268.
- Kloosterman T. G., Hendriksen W. T., Bijlsma J. J., Bootsma H. J., Van Hijum S. A., Kok J., Hermans P. W., Kuipers O. P.** (2006). Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem. **281 (35)**: 25097-25109.
- Klugman K. P.** (1990). Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev. **3 (2)**: 171-196.
- Klugman K. P. and Koornhof H. J.** (1988). Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. J Infect Dis. **158 (5)**: 956-964.
- König A., Reinert R. R., Hakenbeck R.** (1998). *Streptococcus mitis* with unusually high level resistance to beta-lactam antibiotics. Microb Drug Resist. **4 (1)**: 45-49.
- Kosowska K., Jacobs M. R., Bajaksouzian S., Koeth L., Appelbaum P. C.** (2004). Alterations of penicillin-binding proteins 1A, 2X, and 2B in *Streptococcus pneumoniae* isolates for which amoxicillin MICs are higher than penicillin MICs. Antimicrob Agents Chemother. **48 (10)**: 4020-4022.
- Krauss J. and Hakenbeck R.** (1997). A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. Antimicrob Agents Chemother. **41 (5)**: 936-942.
- Krauss J., Van Der Linden M., Grebe T., Hakenbeck R.** (1996). Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist. **2 (2)**: 183-186.
- Lacks S. and Hotchkiss R. D.** (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. Biochim Biophys Acta. **39** 508-518.
- Laible G. and Hakenbeck R.** (1991). Five independent combinations of mutations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. **173 (21)**: 6986-6990.
- Laible G., Spratt B. G., Hakenbeck R.** (1991). Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol. **5 (8)**: 1993-2002.

- Lee M. S. and Morrison D. A.** (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol.* **181 (16)**: 5004-5016.
- Liepinsh E., Leonchiks A., Sharipo A., Guignard L., Otting G.** (2003). Solution structure of the R3H domain from human Subp-2. *J Mol Biol.* **326 (1)**: 217-223.
- Limpert E., Stahel W. A., Abbt M.** (2001). Log-normal distributions across the sciences: keys and clues. *BioScience.* **51 (5)**: 341-352.
- Llarrull L. I., Testero S. A., Fisher J. F., Mobashery S.** (2010). The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol.* **13 (5)**: 551-557.
- Lloyd A. J., Gilbey A. M., Blewett A. M., De Pascale G., El Zoeiby A., Levesque R. C., Catherwood A. C., Tomasz A., Bugg T. D., Roper D. I., Dowson C. G.** (2008). Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *J Biol Chem.* **283 (10)**: 6402-6417.
- Lunde B. M., Moore C., Varani G.** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8 (6)**: 479-490.
- Lux T., Nuhn M., Hakenbeck R., Reichmann P.** (2007). Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **189 (21)**: 7741-7751.
- Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A.** (2006). Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev.* **30 (5)**: 673-691.
- Macheboeuf P., Di Guilmi A. M., Job V., Vernet T., Dideberg O., Dessen A.** (2005). Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102 (3)**: 577-582.
- Maes M. and Messens E.** (1992). Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.* **20 (16)**: 4374.
- Marmur J.** (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol.* **3** 202-218.
- Martin C., Sibold C., Hakenbeck R.** (1992). Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *Embo J.* **11 (11)**: 3831-3836.
- Marton A., Gulyas M., Muñoz R., Tomasz A.** (1991). Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis.* **163 (3)**: 542-548.
- Mascher T., Zähler D., Merai M., Balmelle N., De Saizieu A. B., Hakenbeck R.** (2003). The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol.* **185 (1)**: 60-70.

- Matunis M. J., Michael W. M., Dreyfuss G.** (1992). Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol.* **12 (1)**: 164-171.
- Mitchell J.** (2011). *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol.* **26 (2)**: 89-98.
- Mitchell T. J.** (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol.* **1 (3)**: 219-230.
- Moreillon P., Markiewicz Z., Nachman S., Tomasz A.** (1990). Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* **34 (1)**: 33-39.
- Morlot C., Noirclerc-Savoye M., Zapun A., Dideberg O., Vernet T.** (2004). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **51 (6)**: 1641-1648.
- Morlot C., Pernot L., Le Gouellec A., Di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O., Dessen A.** (2005). Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* **280 (16)**: 15984-15991.
- Mouz N., Di Guilmi A. M., Gordon E., Hakenbeck R., Dideberg O., Vernet T.** (1999). Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem.* **274 (27)**: 19175-19180.
- Mouz N., Gordon E., Di Guilmi A. M., Petit I., Petillot Y., Dupont Y., Hakenbeck R., Vernet T., Dideberg O.** (1998). Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95 (23)**: 13403-13406.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51 Pt 1** 263-273.
- Muñoz R., Dowson C. G., Daniels M., Coffey T. J., Martin C., Hakenbeck R., Spratt B. G.** (1992). Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **6 (17)**: 2461-2465.
- Musco G., Stier G., Joseph C., Castiglione Morelli M. A., Nilges M., Gibson T. J., Pastore A.** (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell.* **85 (2)**: 237-245.
- Nagai K., Davies T. A., Jacobs M. R., Appelbaum P. C.** (2002). Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **46 (5)**: 1273-1280.
- Nichol K. A., Zhanel G. G., Hoban D. J.** (2002). Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46 (10)**: 3261-3264.

- Ottolenghi E. and Hotchkiss R. D.** (1962). Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med.* **116** 491-519.
- Pagliero E., Chesnel L., Hopkins J., Croize J., Dideberg O., Vernet T., Di Guilmi A. M.** (2004). Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **48** (5): 1848-1855.
- Paik J., Kern I., Lurz R., Hakenbeck R.** (1999). Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol.* **181** (12): 3852-3856.
- Pares S., Mouz N., Pétillot Y., Hakenbeck R., Dideberg O.** (1996). X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol.* **3** (3): 284-289.
- Park I. H., Pritchard D. G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M. C., Nahm M. H.** (2007). Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* **45** (4): 1225-1233.
- Pasteur L.** (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med.* **10** 94-103.
- Pestova E. V., Håvarstein L. S., Morrison D. A.** (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol.* **21** (4): 853-862.
- Peterson S. N., Sung C. K., Cline R., Desai B. V., Snesrud E. C., Luo P., Walling J., Li H., Mintz M., Tsegaye G., Burr P. C., Do Y., Ahn S., Gilbert J., Fleischmann R. D., Morrison D. A.** (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol.* **51** (4): 1051-1070.
- Potgieter E., Carmichael M., Koornhof H. J., Chalkley L. J.** (1992a). *In vitro* antimicrobial susceptibility of viridans streptococci isolated from blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **11** (6): 543-546.
- Potgieter E. and Chalkley L. J.** (1995). Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **1** (1): 35-42.
- Potgieter E., Koornhof H. J., Chalkley L. J.** (1992b). Penicillin-binding proteins in *Streptococcus mitis*. *Curr Microbiol.* **24** 289-294.
- Prutscher J.** (2008). Die Rolle von PBP1b bei der  $\beta$ -Lactam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Reichmann P., König A., Liñares J., Alcaide F., Tenover F. C., Mcdougal L., Swidsinski S., Hakenbeck R.** (1997). A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* **176** (4): 1001-1012.

- Reichmann P., König A., Marton A., Hakenbeck R.** (1996). Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **2 (2)**: 177-181.
- Reichmann P., Varon E., Günther E., Reinert R. R., Lüttiken R., Marton A., Geslin P., Wagner J., Hakenbeck R.** (1995). Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Germany: genetic relationship to clones from other European countries. *J Med Microbiol.* **43 (5)**: 377-385.
- Rimini R., Jansson B., Feger G., Roberts T. C., De Francesco M., Gozzi A., Faggioni F., Domenici E., Wallace D. M., Frandsen N., Polissi A.** (2000). Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol Microbiol.* **36 (6)**: 1279-1292.
- Rohrer S. and Berger-Bachi B.** (2003). FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother.* **47 (3)**: 837-846.
- Rohrer S., Ehlert K., Tschierske M., Labischinski H., Berger-Bachi B.** (1999). The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96 (16)**: 9351-9356.
- Rutschmann J.** (2011). PBP2a als Resistenzdeterminante in Labormutanten und klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Salles C., Creancier L., Claverys J. P., Mejean V.** (1992). The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20 (22)**: 6103.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanbongi Y., Ida T., Ishikawa M., Osaki Y., Kataoka H., Suzuki T., Kondo K., Ohsawa F., Yonezawa M.** (2004). Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* **48 (6)**: 2244-2250.
- Sauerbier J., Maurer P., Rieger M., Hakenbeck R.** (2012). Molecular analysis of high beta-lactam resistant transformants of *Streptococcus pneumoniae* R6 obtained with *Streptococcus mitis* B6 DNA; Manuskript in Vorbereitung.
- Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A., Charlier P.** (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* **32 (2)**: 234-258.
- Schuster C., Dobrinski B., Hakenbeck R.** (1990). Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J Bacteriol.* **172 (11)**: 6499-6505.

- Severin A., Figueiredo A. M., Tomasz A.** (1996). Separation of abnormal cell wall composition from penicillin resistance through genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **178 (7)**: 1788-1792.
- Severin A., Schuster C., Hakenbeck R., Tomasz A.** (1992). Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **174 (15)**: 5152-5155.
- Severin A. and Tomasz A.** (1996). Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **178 (1)**: 168-174.
- Sibold C., Henrichsen J., Konig A., Martin C., Chalkley L., Hakenbeck R.** (1994). Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol.* **12 (6)**: 1013-1023.
- Siomi H., Matunis M. J., Michael W. M., Dreyfuss G.** (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* **21 (5)**: 1193-1198.
- Smith A. M., Feldman C., Massidda O., Mccarthy K., Ndiweni D., Klugman K. P.** (2005). 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.* **49 (5)**: 2002-2007.
- Smith A. M. and Klugman K. P.** (1995). Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39 (4)**: 859-867.
- Smith A. M. and Klugman K. P.** (1998). Alterations in PBP 1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42 (6)**: 1329-1333.
- Smith A. M. and Klugman K. P.** (2001). Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45 (8)**: 2393-2396.
- Smith A. M. and Klugman K. P.** (2005). Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49 (11)**: 4622-4627.
- Smyth G. K. and Speed T.** (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* **31 (4)**: 265-273.
- Sternberg G. M.** (1881). A fatal form of septicemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Nat. Board Health Bull.* **2** 781-783.
- Studier F. W. and Moffatt B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189 (1)**: 113-130.

- Sung C. K., Li H., Claverys J. P., Morrison D. A.** (2001). An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* **67 (11)**: 5190-5196.
- Tipper D. J. and Strominger J. L.** (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **54 (4)**: 1133-1141.
- Todorova K.** (2010).  $\beta$ -Lactam-Resistenz in *Streptococcus* spp.: Eine neue Resistenzdeterminante *murE*. Dissertation Technische Universität Kaiserslautern.
- Tomasz A.** (1979). The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **33** 113-137.
- Tomasz A. and Mosser J. L.** (1966). On the nature of the pneumococcal activator substance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **55 (1)**: 58-66.
- Tran T. D., Kwon H. Y., Kim E. H., Kim K. W., Briles D. E., Pyo S., Rhee D. K.** (2011). Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Valverde R., Edwards L., Regan L.** (2008). Structure and function of KH domains. *Febs J.* **275 (11)**: 2712-2726.
- Vollmer W.** (2007). Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. In: *Molecular biology of streptococci.* (Hrsg. R. Hakenbeck, S. Chhatwal). Horizon Scientific Press. 531-535.
- Weber B., Ehlert K., Diehl A., Reichmann P., Labischinski H., Hakenbeck R.** (2000). The *fib* locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett.* **188 (1)**: 81-85.
- Worbs M., Bourenkov G. P., Bartunik H. D., Huber R., Wahl M. C.** (2001). An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol Cell.* **7 (6)**: 1177-1189.
- Wu M., Reuter M., Lilie H., Liu Y., Wahle E., Song H.** (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* **24 (23)**: 4082-4093.
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Speed T. P.** (2001). Normalization for cDNA microarray data. *Microarrays: Optical Technologies and Informatics.* **4266** 141-152.
- Zapun A., Vernet T., Pinho M. G.** (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev.* **32 (2)**: 345-360.
- Zerfass I., Hakenbeck R., Denapate D.** (2009). An important site in PBP2x of penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: mutational analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother.* **53 (3)**: 1107-1115.

---

**Zhang Y., O'connor J. P., Siomi M. C., Srinivasan S., Dutra A., Nussbaum R. L., Dreyfuss G.** (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J.* **14 (21)**: 5358-5366.

**Zhao G., Meier T. I., Kahl S. D., Gee K. R., Blaszczyk L. C.** (1999). BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* **43 (5)**: 1124-1128.

**Zhao G., Yeh W. K., Carnahan R. H., Flokowitsch J., Meier T. I., Alborn W. E., Jr., Becker G. W., Jaskunas S. R.** (1997). Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol.* **179 (15)**: 4901-4908.



## 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Transkriptionsanalyse von R6  $\Delta$ spr0683 im Vergleich zum Wildtyp R6**

Oligonukleotid	Gen	Mittelwert	Produkt
spr0045	<i>purC</i>	0,07	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthetase
spr0052	<i>purD</i>	0,31	Phosphoribosylglycinamide synthetase
spr0096		3,43	Hypothetical protein, putative LysM domain containing protein
spr0107		4,27	Hypothetical protein
spr0108		3,09	Conserved hypothetical protein
AE007317_305821		6,58	intergenerer Bereich, upstream von spr0307
spr0307	<i>clpL</i>	6,38	ATP-dependent protease ATP-binding subunit
spr0682	<i>rpsP</i>	3,33	30S Ribosomal protein S16
spr0709		3,90	Hypothetical protein
spr0810		3,00	Hypothetical protein
spr1663	<i>pbuX</i>	0,25	Nucleobase:cation symporter for xanthine
spr1875		6,55	Conserved hypothetical protein, putative LysM domain containing protein

Ermitteltes Transkriptionsprofil von R6  $\Delta$ spr0683 verglichen mit dem Wildtyp R6. Die Ergebnisse beruhen auf vier Hybridisierungen auf dem R6/TIGR4-Slide. Die TIGR4-Gene bzw. intergenen Bereiche sowie spr0683 sind nicht aufgelistet. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und mit einem P-Wert kleiner 1 %.

**Tabelle 7.2: Transkriptionsanalyse von R6 spr1851::*janus* im Vergleich zum Wildtyp R6**

Oligonukleotid	Gen	Mittelwert	Produkt
spr0040	<i>thmA</i>	0,26	Amphipathic pore-forming peptide precursor
spr0096		5,52	Hypothetical protein, putative LysM domain containing protein
AE007317_130216		4,05	intergenerer Bereich, upstream von spr0122
spr0127		0,26	<i>cibB</i> Homolog
spr0289		3,44	Hypothetical protein
AE007317_305821		14,19	intergenerer Bereich, upstream von spr0307
spr0307	<i>clpL</i>	11,58	ATP-dependent protease ATP-binding subunit
AE007317_461579		3,12	intergenerer Bereich, upstream von spr0455
spr0455	<i>dnaK</i>	3,21	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)
spr0461	<i>blpT</i>	0,30	Hypothetical protein

Oligonukleotid	Gen	Mittelwert	Produkt
spr0465		0,27	Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type
spr0470		0,20	Hypothetical protein
spr0471		0,18	Hypothetical protein
spr0472	<i>blpY</i>	0,25	BlpY protein
spr0473	<i>blpZ</i>	0,26	Hypothetical protein
spr0474	<i>pncP</i>	0,32	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate
spr0709		3,70	Hypothetical protein
spr0856	<i>celA</i>	0,28	Competence protein
spr0857	<i>celB</i>	0,27	Competence protein
spr0858		0,31	Hypothetical protein
spr0859		0,28	Hypothetical protein
spr0860		0,29	Hypothetical protein
spr0996	<i>radC</i>	0,24	DNA repair protein
spr1120	<i>glnP</i>	4,07	ABC transporter membrane spanning permease - glutamine transport
spr1121	<i>glnQ</i>	3,82	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport
spr1144	<i>smf</i>	0,27	DNA processing Smf protein
spr1545		0,25	Hypothetical protein
spr1546	ABC-NBD	0,27	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate
spr1547		0,27	Hypothetical protein
spr1548		0,27	Hypothetical protein
spr1549		0,24	Hypothetical protein
spr1850		56,32	Hypothetical protein
spr1873		3,08	Conserved hypothetical protein
spr1875		9,11	Conserved hypothetical protein, putative LysM domain containing protein
spr2006	<i>cbpD</i>	0,33	Choline binding protein D

Ermitteltes Transkriptionsprofil von R6 spr1851::*janus* verglichen mit dem Wildtyp R6. Die Ergebnisse beruhen auf vier Hybridisierungen auf dem R6/TIGR4-Slide. Die TIGR4-Gene bzw. intergenen Bereiche sowie spr1851 sind nicht aufgelistet. Gezeigt sind die positiven Hybridisierungssignale mit Intensitätsverhältnissen kleiner oder gleich 0,33 bzw. größer oder gleich 3 und mit einem P-Wert kleiner 1 %.

## Publikationen

**Maurer P., Todorova K., Sauerbier J., Hakenbeck R.** (2012). Mutations in *Streptococcus pneumoniae* PBP2x: importance of the C-terminal PASTA-domains for beta-lactam binding. *Microb Drug Resist*; eingereicht.

**Sauerbier J., Maurer P., Rieger M., Hakenbeck R.** (2012). Molecular analysis of high beta-lactam resistant transformants of *Streptococcus pneumoniae* R6 obtained with *Streptococcus mitis* B6 DNA; Manuskript in Vorbereitung.

## Danksagung

Jetzt ist es an der Zeit einigen Menschen Danke zu sagen, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die Betreuung und das große Interesse an meiner Arbeit sowie die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, die mich stets motiviert haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. John Cullum für die Erstellung des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Patrick Maurer für seine Hilfsbereitschaft, die vielen Ratschläge und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Vielen Dank an Dr. Reinhold Brückner für die hilfreichen Anregungen im Zusammenhang mit meinen hypothetischen Proteinen.

Danke an alle Kollegen aus dem Labor für nützliche Tipps, eine angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht dabei an Kathi und Patrick für eine gute und unterhaltsame Laborzeit. Miriam möchte ich für die wunderbaren und lustigen Jahre in unserem gemeinsamen Büro danken.

Danke an Anke, Miriam, Tina und Uli für eure Unterstützung bei der Arbeit, Aufmunterungen an trüben Tagen, pünktliche Mensabesuche, Kaffeepausen in der Sonne und einfach eine schöne Zeit!

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich immer begleitet hat und an mich glaubt. Isi, möchte ich für eine tolle Freundschaft danken. Danke für eure Geduld und, dass ihr mir mit Rat und Tat zur Seite steht.

Zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an meinen Ehemann Martin, dem ich für den großartigen Rückhalt, die vielen motivierenden Worte und seine tatkräftige Unterstützung dankbar bin!

## Lebenslauf

### Schul- und Berufsausbildung

- |                   |  |
|-------------------|--|
| seit 11/2008      | Technische Universität Kaiserslautern<br>wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung<br>Mikrobiologie zur Promotion   |
| 10/2003 – 09/2008 | Technische Universität Kaiserslautern<br>Studium der Biologie (Hauptfach: Mikrobiologie)<br>Abschluss: Diplom<br>Thema der Diplomarbeit: „Die Rolle von PBP1b bei der<br>$\beta$ -Lactamresistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i> “ |
| 08/1993 – 03/2002 | Maria Ward - Gymnasium Mainz<br>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife   |