

Der Abbau des essentiellen Penicillin-Bindeproteins 2x in *S. pneumoniae* durch die Serinprotease HtrA

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

von

Dipl.-Biol. Katharina Peters

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 12.04.2013

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2013

D386

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, Katharina Peters, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.
Rodenbach, den 28.02.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	2
1.2 Penicillin-Bindeproteine in <i>S. pneumoniae</i> und β-Laktamantibiotika.....	4
1.2.1 Peptidoglykansynthese und Penicillin-Bindeproteine in <i>S. pneumoniae</i>	4
1.2.2 β -Laktamantibiotika und ihre Wirkungsweise	7
1.2.3 β -Laktam-Resistenz in <i>S. pneumoniae</i>	7
1.3 Das essentielle Penicillin-Bindeprotein 2x aus <i>S. pneumoniae</i>	9
1.3.1 Das grün fluoreszierende Protein GFP und GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte.....	11
1.4 Das Zwei-Komponenten System CiaRH	14
1.5 Die Serinprotease HtrA	15
1.5.1 HtrA in <i>S. pneumoniae</i>	16
1.6 Die Cefotaxim-resistenten Labormutanten <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606	19
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	25
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Bakterienstämme.....	28
2.2 Plasmide	32
2.3 Oligonukleotide.....	33
2.4 Nährmedien.....	38
2.4.1 C-Medium (CpH8)	38
2.4.2 THY-Medium	40
2.4.3 D-Blutagar	40
2.4.3 Lysogeny-Broth (LB) Medium und Agar.....	41
2.5 Nährmediumzusätze.....	41
2.6 Mikrobiologische Methoden.....	42
2.6.1 Stammkonservierung	42
2.6.2 Anzuchtbedingungen	42
2.6.3 Wachstumsmessung.....	43
2.6.3.1 Wachstumsanalysen mit Temperaturshift.....	44
2.6.3.2 Depletionsexperimente	44

2.6.4	Mikroskopie.....	45
2.6.4.1	Phasenkontrastmikroskopie	45
2.6.4.2	Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von GFP-Fusionskonstrukten	45
2.6.5	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	47
2.6.6	Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	48
2.6.6.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	48
2.6.6.2	Transformation.....	48
2.6.7	Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.6.7.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	49
2.6.7.2	Transformation.....	50
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.7.1	Isolierung, Aufreinigung und Nachweis von Nukleinsäuren	51
2.7.1.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	51
2.7.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	52
2.7.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	52
2.7.1.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	54
2.7.1.5	Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	54
2.7.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	54
2.7.2	Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren	55
2.7.2.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	55
2.7.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
2.7.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	55
2.7.2.4	DNA-Sequenzierung.....	61
2.7.3	Chromosomale Modifikation von <i>S. pneumoniae</i>	61
2.7.3.1	Herstellung von <i>htrA</i> -Deletionsderivaten mit Hilfe einer Kanamycin-Resistenzkassette	61
2.7.3.2	Herstellung von <i>htrA</i> -Deletionsderivaten mittels Cheshire-Kassette.....	63
2.7.3.3	Herstellung von <i>htrA</i> -Komplementationsderivate	66
2.7.3.4	Herstellung von <i>HtrA</i> _{S234A} -Derivaten mittels gerichteter Mutagenese.....	70
2.7.3.5	Herstellung der Stämme <i>S. pneumoniae</i> R6 2xC405 <i>ciaHC305</i> und R6 2xC606 <i>ciaHC306</i> mittels Janus-Kassette.....	72
2.7.3.6	Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte.....	74
2.7.3.7	Herstellung der <i>pbp2x</i> -Deletionskonstrukte	76
2.8	Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität.....	77
2.8.1	Konstruktion des Plasmids pKP02	77
2.8.2	Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität	79
2.9	Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	81
2.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	81
2.9.1.1	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele	82
2.9.1.2	Herstellung der Zelllysate	83
2.9.1.3	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese.....	84
2.9.2	Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele	85
2.9.3	Detektion von Penicillin-Bindeproteinen mit Bocillin.....	85
2.9.4	Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot.....	86
2.9.4.1	Quantifizierung von Proteinmengenunterschieden mittels ECL	89
2.9.5	Überexpression von Proteinen.....	91
2.9.5.1	Überexpression von Proteinen mittels GST-Tag.....	91
2.9.5.2	Überexpression von Proteinen mittels His ₆ -Tag.....	94

2.9.5.3 Umpufferung von Proteinen	95
2.9.5.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	95
2.9.6 Herstellung und Überprüfung der Antiseren gegen HtrA	96
2.10 Protein-Protein Interaktionsstudien.....	97
2.10.1 Interaktionsstudien mit β -Casein als Substrat	97
2.10.2 Interaktionsstudien mit PBP2x als Substrat.....	98
2.11 Zirkulardichroismus-Spektrometrie zur Analyse von Strukturunterschieden in Proteinen.....	99
3 ERGEBNISSE.....	100
3.1 Eigenschaften der Labormutanten <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606.....	101
3.1.1 Verringerte Menge des essentiellen PBP2x und die Rolle der Serinprotease HtrA	101
3.1.1.1 Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von HtrA in den Laborstämmen C405 und C606.....	102
3.1.2 Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge in der <i>S. pneumoniae</i> R6 Zelle	104
3.1.3 Quantifizierung des Mengenunterschieds von PBP2x in den Stämmen R6 und C405	107
3.1.4 Veränderte Menge an PBP1a in den Laborstämmen C405 und C606 und eine mögliche Rolle von HtrA	108
3.1.5 Zusätzliche Proteine in den Labormutanten C405 und C606.....	110
3.2 CD-Spektren der unterschiedlichen GST-PBP2x-Fusionskonstrukte	112
3.3 Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme mit PBP2x-Mutationen aus C405 und C606 im genetischen Hintergrund von R6.....	115
3.4 Wachstumsanalysen der Ausgangsstämme und Unterschiede in der Morphologie	118
3.5 Resistenzunterschiede der Ausgangsstämme.....	122
3.6 Nachstellung der Situation im definierten genetischen Hintergrund.....	126
3.6.1 <i>In vivo</i> -Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren P_{htrA} , P_{vegM} und $P_{16S\ rRNA}$	126
3.6.2 Komplementationsstudien von <i>htrA</i> im genetischen Hintergrund von R6.....	129
3.6.2.1 Komplementationsstudien mit den Konstrukten P_{htrA} - <i>htrA</i> und P_{vegM} - <i>htrA</i>	129
3.6.2.2 Komplementationsstudien mit den Konstrukten $P_{16S\ rRNA}$ - <i>htrA</i>	132
3.6.3 Komplementationsstudien von <i>htrA</i> im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC606} -T6	135
3.6.4 Komplementationsstudien von <i>htrA</i> im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC405} -T6	138
3.6.5 Auswirkung der PBP2x-Mutationen und der <i>ciaH</i> -Allele auf die PBP2x-Menge..	142
3.6.5.1 Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C606 und des <i>ciaH306</i> -Allels auf die PBP2x-Menge.....	142
3.6.5.2 Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C405 und des <i>ciaH305</i> -Allels auf die PBP2x-Menge.....	144
3.7 Charakterisierung von HtrA mittels Wachstumsanalysen und MHK.....	146
3.7.1 Wachstumsanalysen und Studien der Zellmorphologie zur Untersuchung der Temperatursensitivität von HtrA.....	146
3.7.2 Der Einfluss der Serinprotease HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz	152

3.8 Untersuchung der Lokalisation des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins.....	157
3.8.1 Immunodetektion von PBP2x und GFP-PBP2x-Proteinen in den Fusions- konstrukten und den <i>pbp2x</i> -Deletionskonstrukten.....	158
3.8.2 Lokalisationsstudien der GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte und der <i>pbp2x</i> - Deletionskonstrukte.....	162
3.8.2.1 Führt die verringerte Menge des GFP-PBP2x _{C405} -Proteins zu Unterschieden in der Lokalisation in den Stämmen <i>S. pneumoniae</i> KPKL8 und KPKL7?.....	162
3.8.2.2 Wirkt sich die Deletion des nativen PBP2x aus C405 auf die Lokalisation der GFP-PBP2x _{C405} -Fusionsproteine aus?	167
3.8.3 Die verringerte Menge des GFP-PBP2x _{C405} -Fusionsproteins und die Rolle der Serinprotease HtrA.....	172
3.9 Depletionsexperimente mit GFP-PBP2x und GFP-PBP2x_{C405}.....	181
3.9.1 Die Verringerung an GFP-PBP2x in DKL031 führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen und zum Wachstumsstopp.....	184
3.9.2 Depletionsexperimente mit den konditionalen GFP-PBP2x _{C405} -Stämmen KPKL71 und KPKL81 und die Rolle der Serinprotease HtrA.....	187
3.9.3 Wirkt sich das Fehlen der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 auf das Wachstum und die Zellmorphologie innerhalb der Depletionsexperimente aus?.....	194
3.10 Lokalisationsstudien einzelner PBP2x-Domänen im Zusammenhang mit HtrA... 196	
3.11 Überexpression der Serinprotease HtrA.....	204
3.11.1 Überexpression des proteolytisch inaktiven Form von HtrA	204
3.11.1.1 Überprüfung der Antikörper α -HtrA 12003 und 12004	207
3.11.2 Überexpression des proteolytisch aktiven Proteins HtrA mittels His ₆ -Tag	208
3.12 In vitro-Studien	211
3.12.1 Interaktionsstudien mit β -Casein als Substrat	211
3.12.2 Interaktionsstudien mit PBP2x als Substrat.....	214
4 DISKUSSION	220
4.1 Quantifizierungsstudien mit PBP2x	221
4.1.1 Quantifizierung der Molekülmenge von PBP2x in der <i>S. pneumoniae</i> R6 Zelle....	221
4.1.2 Quantifizierung des Mengenunterschieds an PBP2x in C405 und R6	222
4.2 PBP2x-Mutationen und ihre Folgen	223
4.2.1 Auswirkungen auf die PBP2x-Mengen	223
4.2.2 Auswirkungen auf die β -Laktam-Resistenz	224
4.2.3 Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie	225
4.2.4 Strukturelle Analysen mittels CD-Spektrometrie.....	226
4.3 Verringerte PBP2x-Menge, erhöhte PBP1a-Menge - eine mögliche Rolle der Serinprotease HtrA.....	227
4.4 Die Überexpression der Serinprotease HtrA ist ab einem bestimmten Level schädlich für <i>S. pneumoniae</i> - die Zelle wehrt sich.....	228

4.5 Charakterisierung von HtrA in <i>S. pneumoniae</i>	231
4.5.1 Wann ist HtrA temperatursensitiv?	231
4.5.2 Einfluss von HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz.....	233
4.6 Lokalisationsstudien mit den Fusionsproteinen GFP-PBP2x und dem nieder- affinen GFP-PBP2x_{C405}	234
4.7 Auswirkungen der Depletion der Fusionsproteine GFP-PBP2x und GFP- PBP2x_{C405} und der Einfluss der Serinprotease HtrA	237
4.8 Die proteolytische Aktivität der Serinprotease HtrA und seine Substrate in <i>S. pneumoniae</i>	241
4.9 Ausblick	244
5 ZUSAMMENFASSUNG	246
6 LITERATURVERZEICHNIS	249
7 ANHANG	281
DANKSAGUNG	284
LEBENS LAUF	286
PUBLIKATIONEN	287

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Morphologie von <i>S. pneumoniae</i>	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Grundstruktur des Peptidoglykans in <i>S. pneumoniae</i> und die katalysierten Reaktionen der PBPs.....	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der sechs Penicillin-Bindeproteine aus <i>S. pneumoniae</i>	6
Abb. 1.4: Schematischer Aufbau und dreidimensionale Struktur des PBP2x aus dem sensitiven Stamm <i>S. pneumoniae</i> R6.....	10
Abb. 1.5: Dreidimensionale Struktur des Wildtyp-GFP.....	11
Abb. 1.6: Aufbau diverser GFP-PBP2x-Fusionsproteine und deren ermittelte Lokalisation.....	13
Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und dreidimensionale Struktur der PDZ-Domäne der Serinprotease HtrA aus <i>S. pneumoniae</i>	17
Abb. 1.8: Schematische Übersicht der spontan Cefotaxim-resistenten Labormutanten C405 und C606.....	20
Abb. 1.9: Dreidimensionale Struktur des PBP2x der Labormutante <i>S. pneumoniae</i> C405.....	21
Abb. 1.10: Dreidimensionale Struktur des PBP2x der Labormutante <i>S. pneumoniae</i> C606.....	22
Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Histidinkinase CiaH und die Lokalisation der Aminosäureaustausche, die durch die <i>ciaH</i> -Allele 305 und 306 vermittelt werden...	23
Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des Zwei-Komponenten Systems aus <i>S. pneumoniae</i> und die Lokalisation der Proteine PBP2x und HtrA.....	24
Abb. 2.1: Insertionsdeletion des <i>htrA</i> Gens mittels Integration einer Kanamycin-Resistenzkassette.....	62
Abb. 2.2: Deletion des <i>htrA</i> Gens mittels Cheshire-Kassette.....	63
Abb. 2.3: Vorgehensweise bei der Deletion des <i>htrA</i> Gens mittels Cheshire-Kassette.....	64
Abb. 2.4: Genetische Organisation der <i>htrA</i> -Komplementationsstämme nach Integration in das Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	66
Abb. 2.5: Integrationsstellen der Plasmide pPP2 und pSW1 im Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	67
Abb. 2.6: Genetische Organisation des Plasmids pKP01.....	67
Abb. 2.7: Strategie zur Herstellung von HtrA _{S234A} -Derivaten.....	70
Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Strategie zur Einführung des <i>ciaH306</i> -Allels mit Hilfe der Janus-Kassette.....	72
Abb. 2.9: Genetische Organisation des pFP12 Plasmids und dessen Integration in das Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	74
Abb. 2.10: Genetische Organisation des p2xKO Plasmids und Integration des Gens <i>aad9</i> in das Genom von <i>S. pneumoniae</i>	76
Abb. 2.11: Genetische Organisation des Plasmids pKP02 und dessen Integration in das Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	78
Abb. 2.12: Aufbau eines Western-Blots.....	87
Abb. 3.1: Untersuchung der PBP2x- und HtrA-Mengen in <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606 in An- und Abwesenheit von HtrA mittels Western-Blotanalysen.....	102
Abb. 3.2: Untersuchung der Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von HtrA mittels Western-Blotanalysen.....	103

Abb. 3.3: Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge pro <i>S. pneumoniae</i> R6 Zelle mittels Western-Blotanalyse mit ECL.....	105
Abb. 3.4: Auswertung des Western-Blots zur Quantifizierung der PBP2x-Moleküle pro Zelle.....	106
Abb. 3.5: Quantifizierung des Proteinmengenunterschieds an PBP2x in den Stämmen <i>S. pneumoniae</i> R6 und C405 mittels ECL.....	107
Abb. 3.6: Unterschiede in der β -Laktam-Affinität von PBP1a in den Stämmen <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606.....	109
Abb. 3.7: Untersuchung der PBP1a-Mengen in <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606 in An- und Abwesenheit von HtrA.....	110
Abb. 3.8: Detektion von zusätzlichen Proteinen in den Stämmen <i>S. pneumoniae</i> C405 und C606.....	111
Abb. 3.9: Coomassiegel zur Detektion von zusätzlichen Proteinen in den Stämmen <i>S. pneumoniae</i> RKL162 und RKL191.....	112
Abb. 3.10: Proteinsynthese von GST-PBP2x _{wt} aus <i>S. pneumoniae</i> R6.....	113
Abb. 3.11: Umpufferung und Entsalzung der GST-PBP2x-Proteine über PD-10 Säulen.....	114
Abb. 3.12: Zirkulardichroismus-Spektren von GST-PBP2x aus <i>S. pneumoniae</i> R6, C405 und C606 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	115
Abb. 3.13: Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme mit PBP2x-Mutationen aus C405 oder C606 im genetischen Hintergrund von R6 mittels Western-Blotanalysen.....	116
Abb. 3.14: Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme R6 _{pbp2xC405} -T6 und R6 _{pbp2xC606} -T6 mittels Western-Blotanalysen.....	117
Abb. 3.15: Wachstumsanalysen der Ausgangsstämme bei 30 °C und bei 37 °C.....	118
Abb. 3.16: Vergleich der Zellgröße und der Morphologie der Stämme <i>S. pneumoniae</i> R6, C405 und R6 _{pbp2xC405} -T6.....	121
Abb. 3.17: Resistenz der Ausgangsstämme gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C.....	123
Abb. 3.18: Promotorregion des <i>16S rRNA</i> -Promotors aus <i>S. pneumoniae</i> nach der Klonierung in pPP2.....	127
Abb. 3.19: Promotoraktivitäten der Promotoren P _{htrA} , P _{vegM} und P _{16S rRNA} in <i>S. pneumoniae</i> R6.....	128
Abb. 3.20: Untersuchung der Komplementationsstämme KPKL11 und KPKL12 mittels Western-Blotanalysen zur Detektion der HtrA-Mengen.....	130
Abb. 3.21: Wachstumsanalysen der Stämme <i>S. pneumoniae</i> KPKL11, KPKL12 und den Kontrollstämmen R6, KPKL1 bei 30 °C und bei 37 °C.....	131
Abb. 3.22: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 mittels Western-Blotanalysen.....	133
Abb. 3.23: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC606} -T6 mittels Western-Blotanalysen.....	137
Abb. 3.24: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC405} -T6 mittels Western-Blotanalysen.....	140
Abb. 3.25: Untersuchung der PBP2x-Mengen im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC606} -T6 mit dem <i>ciaH306</i> -Allel.....	143
Abb. 3.26: Untersuchung der PBP2x- und HtrA-Mengen im genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC405} -T6 mit dem <i>ciaH305</i> -Allel.....	145

Abb. 3.27: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in <i>S. pneumoniae</i> R6.....	147
Abb. 3.28: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in <i>S. pneumoniae</i> R6 mit verändertem PBP2x aus C405.....	148
Abb. 3.29: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in <i>S. pneumoniae</i> R6 mit verändertem PBP2x aus C606.....	149
Abb. 3.30: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in <i>S. pneumoniae</i> C405.....	150
Abb. 3.31: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in <i>S. pneumoniae</i> C606.....	152
Abb. 3.32: Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> R6, KPKL1 und KPKL14 gegen das β -Laktam- antibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C.....	153
Abb. 3.33: Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> C405, KPKL5 und KPKL51 gegen das β -Laktam- antibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C.....	154
Abb. 3.34: Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC405} -T6 und KPKL3 gegen das β -Laktam- antibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C.....	155
Abb. 3.35: Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{pbp2xC606} -T6 und KPKL4 gegen das β -Laktam- antibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C.....	156
Abb. 3.36: Western-Blotanalyse mit α -PBP2x-Antikörpern zur Detektion von PBP2x und GFP-PBP2x _{C405} -Fusionsproteinen.....	159
Abb. 3.37: Western-Blotanalyse mit α -PBP2x und α -PBP1a-Antikörpern der GFP-Stämme im genetischen Hintergrund von R6 _{pbp2xC405} -T6 und C405.....	160
Abb. 3.38: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x _{C405} - Fusionsproteinen in Zelllysaten der GFP-Stämme im genetischen Hintergrund von R6 _{pbp2xC405} -T6 und C405.....	161
Abb. 3.39: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> DKL03.....	163
Abb. 3.40: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL8.....	164
Abb. 3.41: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL7.....	164
Abb. 3.42: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme <i>S. pneumoniae</i> DKL03, KPKL8 und KPKL7.....	166
Abb. 3.43: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> DKL031.....	168
Abb. 3.44: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL81.....	168
Abb. 3.45: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL71.....	169
Abb. 3.46: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme <i>S. pneumoniae</i> DKL031, KPKL81 und KPKL71.....	171
Abb. 3.47: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x- Fusionsproteinen in Zelllysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL7, KPKL71 und KPKL711.....	173
Abb. 3.48: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x- Fusionsproteinen in Zelllysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL8, KPKL81 und KPKL811.....	174
Abb. 3.49: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL811.....	175
Abb. 3.50: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL711.....	176
Abb. 3.51: Western-Blotanalyse mit α -GFP- und α -HtrA-Antikörpern in Zelllysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL09, KPKL81, KPKL811, KPKL71 und KPKL711.....	177
Abb. 3.52: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>S. pneumoniae</i> KPKL09.....	179

Abb. 3.53: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme <i>S. pneumoniae</i> KPKL09, KPKL811 und KPKL711.....	180
Abb. 3.54: Wachstum von <i>S. pneumoniae</i> DKL031, KPKL81 und KPKL71 in Abwesenheit von Zn ²⁺	182
Abb. 3.55: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> DKL031 in Abwesenheit von Zn ²⁺	184
Abb. 3.56: Morphogenese der Zellen von <i>S. pneumoniae</i> DKL031 in Abwesenheit von Zn ²⁺	186
Abb. 3.57: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> KPKL71 in Abwesenheit von Zn ²⁺	188
Abb. 3.58: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> KPKL711 in Abwesenheit von Zn ²⁺	189
Abb. 3.59: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> KPKL81 in Abwesenheit von Zn ²⁺	191
Abb. 3.60: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> KPKL811 in Abwesenheit von Zn ²⁺	192
Abb. 3.61: Vergleich des Wachstums von <i>S. pneumoniae</i> DKL031 und KPKL09 in Abwesenheit von Zn ²⁺	194
Abb. 3.62: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von diversen GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zelllysaten genetischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	197
Abb. 3.63: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zelllysaten der Stämme DKL031, DKL12, DKL123, DKL17, DKL171, DKL15 und DKL151.....	199
Abb. 3.64: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme <i>S. pneumoniae</i> DKL12 und DKL123.....	200
Abb. 3.65: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme <i>S. pneumoniae</i> DKL17 und DKL171.....	202
Abb. 3.66: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme <i>S. pneumoniae</i> DKL17 und DKL171.....	203
Abb. 3.67: Proteinsynthese der proteolytisch inaktiven Form von HtrA im Stamm <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	205
Abb. 3.68: Umpufferung und Entsalzung der proteolytisch inaktiven Form von HtrA.....	206
Abb. 3.69: Test der finalen Blutung des Antikörpers α -HtrA 12003.....	207
Abb. 3.70: Proteinsynthese der proteolytisch aktiven Form von HtrA im Stamm <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	209
Abb. 3.71: Umpufferung und Entsalzung der proteolytisch aktiven Form von HtrA.....	210
Abb. 3.72: Test der Puffer für die Abbaureaktion von β -Casein durch das zuvor schockgefrorene Protein His ₆ -HtrAoTM.....	212
Abb. 3.73: <i>In vitro</i> β -Casein Assays mit His ₆ -HtrAoTM und His ₆ -HtrA _{S234A} oTM bei optimierten Bedingungen.....	214
Abb. 3.74: <i>In vitro</i> -Assays mit His ₆ -HtrAoTM und GST-PBP2x _{C405} als Substrat.....	215
Abb. 3.75: <i>In vitro</i> -Assays mit His ₆ -HtrAoTM bzw. His ₆ -HtrA _{S234A} oTM und PBP2x _{C405} als Substrat bei 37 °C.....	216

Abb. 3.76: <i>In vitro</i> -Assays mit His ₆ -HtrAoTM bzw. His ₆ -HtrA _{S234A} oTM und PBP2 _{x_{wt}} als Substrat bei 37 °C.....	218
Abb. 4.1: Positionen der identifizierte Veränderungen innerhalb der Protease Domäne der Serinprotease HtrA aus <i>S. pneumoniae</i> , die die proteolytische Aktivität beeinträchtigen.....	229
Abb. 4.2: Lokalisationsmuster der Serinprotease HtrA und der SecA-Untereinheit der Sec-Translokase in <i>S. pneumoniae</i> D39 (modifiziert nach Tsui <i>et al.</i> , 2011) und GFP-PBP2x in <i>S. pneumoniae</i> R6 im Verlauf des Zellteilungszyklus.....	236
Abb. 4.3: Vergleich des Wachstums von <i>S. pneumoniae</i> KPKL71 und KPKL711 in Abwesenheit von Zn ²⁺	239
Abb. 4.4: Vergleich des Wachstums von <i>S. pneumoniae</i> DKL031, KPKL81 und KPKL811 in Abwesenheit von Zn ²⁺	240
Abb. 4.5: Detektierte Abbauprodukte in diversen GFP-PBP2x-Stämmen und definierte Schnittstellen der Serinprotease HtrA.....	242
Abb. 7.1: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> DKL031 in Abwesenheit von Zn ²⁺	282
Abb. 7.2: Wachstum und Zellmorphologie von <i>S. pneumoniae</i> KPKL09 in Abwesenheit von Zn ²⁺	282
Abb. 7.3: <i>In vitro</i> -Assays mit His ₆ -HtrAoTM bzw. His ₆ -HtrA _{S234A} oTM und PBP2 _{x_{C405}} als Substrat bei 30 °C.....	283

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Stämme von <i>S. pneumoniae</i>	28
Tab. 2.2: Für diese Arbeit konstruierte Stämme von <i>S. pneumoniae</i>	29
Tab. 2.3: Verwendete und erstellte Stämme von <i>E. coli</i>	32
Tab. 2.4: Verwendete und erstellte Plasmide.....	32
Tab. 2.5: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>pbp2x</i>	33
Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>ciaRH</i>	34
Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von <i>htrA</i>	34
Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Deletion von <i>htrA</i> mittels Kanamycin-Resistenzkassette und Sequenzierung der Transformanten.....	34
Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Deletion von <i>htrA</i> mittels Cheshire-Kassette und Sequenzierung der Transformanten.....	35
Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pGEM-T-Easy.....	35
Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pSW1 und zur Kontrolle der Integration in das Genom von <i>S. pneumoniae</i>	35
Tab. 2.12: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pPP2 und zur Kontrolle der Integration in das Genom von <i>S. pneumoniae</i>	35
Tab. 2.13: Oligonukleotide zur Herstellung von <i>htrA</i> -Komplementationsderivaten.....	36
Tab. 2.14: Oligonukleotide zur Herstellung von HtrA _{S234A} -Derivaten.....	36
Tab. 2.15: Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung von <i>S. pneumoniae</i> R6 2x _{C606} <i>ciaHC306</i> Transformanten.....	36
Tab. 2.16: Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung von GFP-PBP2x Fusionskonstrukten.....	37
Tab. 2.17: Oligonukleotide für die Herstellung und Sequenzierung von <i>pbp2x</i> -Deletionskonstrukten.....	37
Tab. 2.18: Oligonukleotide für die Überexpression von HtrA Proteinen.....	38
Tab. 2.19: Oligonukleotide zur Überexpression von PBP2x Proteinen mittels GST-Tag.....	38
Tab. 2.20: Zusammensetzung des C-Mediums.....	39
Tab. 2.21: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums.....	39
Tab. 2.22: Zusätze der Einzelkomponenten des C-Mediums.....	40
Tab. 2.23: Zusammensetzung des D-Agars.....	41
Tab. 2.24: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	41
Tab. 2.25: Verwendete Nährmedienzusätze.....	42
Tab. 2.26: Zusammensetzung einer D-Agar Platte zur Bestimmung der MHK.....	47
Tab. 2.27: Lösungen zur Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen und Transformation.....	49
Tab. 2.28: Lösungen zur Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	51
Tab. 2.29: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	53
Tab. 2.30: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der RedGoldstar™ DNA-Polymerase.....	56
Tab. 2.31: PCR-Programm bei Verwendung der RedGoldstar™ DNA-Polymerase.....	57
Tab. 2.32: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der DreamTaq™ DNA-Polymerase.....	57
Tab. 2.33: PCR-Programm bei Verwendung der DreamTaq™ DNA-Polymerase.....	57
Tab. 2.34: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der iProof DNA-Polymerase.....	58
Tab. 2.35: PCR-Programm bei Verwendung der iProof DNA-Polymerase.....	58

Tab. 2.36: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der <i>Pfu</i> DNA-Polymerase..	59
Tab. 2.37: PCR-Programm bei Verwendung der <i>Pfu</i> DNA-Polymerase.....	59
Tab. 2.38: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Überlappenden PCR.....	60
Tab. 2.39: PCR-Programm für die Überlappende PCR.....	61
Tab. 2.40: Lösungen und Puffer zur Durchführung des β -Galaktosidaseassays.....	81
Tab. 2.41: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.....	83
Tab. 2.42: Zusammensetzung des Natriumphosphatpuffers.....	83
Tab. 2.43: Lösungen und Puffer für die SDS-Gelelektrophorese und für die anschließende Coomassie-Färbung.....	84
Tab. 2.44: Lösungen für den Western-Blot.....	88
Tab. 2.45: Verwendete Antikörper.....	89
Tab. 2.46: Verwendete Puffer und Lösungen für die Überexpression von GST-Fusions- proteinen.....	93
Tab. 2.47: Zusammensetzung des Cleavage-Puffers.....	94
Tab. 2.48: Lösungen für die Aufreinigung von His ₆ -Tag Proteinen.....	95
Tab. 2.49: Verwendete Puffer und Lösungen für die Protein-Protein Interaktionsstudien.....	97
Tab. 3.1: Generationszeiten der Ausgangsstämme bei 30 °C und bei 37 °C.....	119
Tab. 3.2: Durch die Promotoren P _{<i>htrA</i>} , P _{<i>vegM</i>} , und P _{<i>16S rRNA</i>} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität im Stamm <i>S. pneumoniae</i> R6.....	128
Tab. 3.3: Generationszeiten der Stämme <i>S. pneumoniae</i> KPCL11, KPCL12 und der Kontrollstämme R6, KPCL1 bei 30 °C und bei 37 °C.....	131
Tab. 3.4: Übersicht der Mutationen in den P _{<i>16S rRNA-htrA</i>} -Komplementationsstämmen im ge- netischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	132
Tab. 3.5: Übersicht der Mutationen in den P _{<i>vegM-htrA</i>} -Komplementationsstämmen im ge- netischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{<i>pbp2xC606</i>} -T6.....	136
Tab. 3.6: Übersicht der Mutationen in den P _{<i>vegM-htrA</i>} -Komplementationsstämmen im gene- tischen Hintergrund von <i>S. pneumoniae</i> R6 _{<i>pbp2xC405</i>} -T6.....	139
Tab. 3.7: Generationszeiten der Stämme <i>S. pneumoniae</i> R6, DKL031, KPCL81, C405 und KPCL71 nach dem Überimpfen in C-Medium bei 30 °C.....	182

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	hmw	high molecular weight
AA	Acrylamid	HRP	horseradish peroxidase
Abb.	Abbildung	HtrA	high temperature requirement A
AG	Arbeitsgruppe	IgG	Immunglobulin G
Amp	Ampicillin	IPTG	Isopropylthiogalaktosid
APS	Ammoniumpersulfat	Kan	Kanamycin
AS	Aminosäure	Kap.	Kapitel
ATP	Adenosintriphosphat	kb	Kilobasen
BAA	Bisacrylamid	kDa	Kilodalton
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	l	Liter
bidest.	bidestilliert	LB	Lysogeny-Broth
bp	Basenpaare	lmw	low molecular weight M Molar
BSA	Bovine Serum Albumine	M	Marker
bzw.	beziehungsweise	mA	Miliampere
BAA	Bisacrylamid	MCS	Multiple Cloning Site
C	Cefotaxim	mg	Milligramm
ca.	circa	mg	Mikrogramm
CD	Zirkulardichroismus	MHK	Minnimale Hermmkonzentration
cDNA	complementary DNA	µl	Mikroliter
cia	competence induction and altered cefotaxime susceptibility	MLSA	Multi Locus Sequence Analysis
cpoA	regulator of competence and PonA	MLST	Multi Locus Sequence Typing
cfu	colony-forming units	µm	Mikrometer
Chloramp	Chloramphenicol	µM	Mikromolar
cm	Zentimeter	min	Minute
Cp	Crossingpoint	ml	Milliliter
CSP	competence stimulating peptide	mm	Millimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mM	Millimolar
ddNTP	Didesoxynukleosid-triphosphat	MOPS	3-Morpholino-1-propan-sulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	N	Nephelwert
DNase	Desoxyribonuklease	NaCl	Natriumchlorid
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat	NAE	NA-Acetat-EDTA
dsDNA	doppelsträngige DNA	NAES	NA-Acetat-EDTA-SDS
ECL	enhanced Chemiluminescence	NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NEB	New England Biolabs
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ng	Nanogramm
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß	nm	Nanometer
Erm	Erythromycin	NP	nur Pasta-Domänen
<i>et al.</i>	und andere	nt	Nukleotid
EtOH	Ethanol	OD	optische Dichte
g	Generationszeit	ONP	o-Nitrophenol
g	Gramm	ONPG	o-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid
GFP	grün fluoreszierendes Protein	OP	ohne Pasta-Domänen
GlcNAc	N-Acetylglukosamin	OT	ohne Transpeptidase-Domäne
GmbH	GmbH Gesellschaft mit beschränkter Haftung	oTM	ohne Transmembrandomäne
GSH	Glutathion	P	Promotor
GST	Glutathion-S-Transferase	p.a.	pro analysis
GST-Tag	Glutathion-S-Transferase-Tag	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
h	Stunde	PASTA	penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	PBP	Penicillin-Bindeprotein

His-Tag	poly-Histidin-Tag
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphat Bufferd Saline Tween
PCR	PCR Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	postsynaptic density of 95 kDa, discs large, and zonula occludens
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Pikomol
pPP2	Promotor Probe Plasmid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	resistent
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotation per minute Umdrehungen pro Minute
RR	Responseregulator
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	siehe
S	sensitiv
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spc	Spectinomycin
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
StkP	Serin/Threonin-Kinase
Str	Streptomycin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
tech.	technisch
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
THB	Todd Hewitt Broth
THY	Todd Hewitt Broth mit Hefe
T _m	Schmelztemperatur
Tmp	Trimethoprim
TTBS	Tris-Buffered Saline
TU	Technische Universität
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
Vis	visible
V	Volt
v/v	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewichtsprozent
z.B	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Das humanpathogene Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (auch als Pneumococcus bekannt) wurde im Jahre 1880 unabhängig voneinander und fast zeitgleich von Louis Pasteur (Pasteur *et al.*, 1881) in Frankreich und von George Miller Sternberg (Sternberg, 1881) in den USA entdeckt und beschrieben. *S. pneumoniae* zählt zu den Gram-positiven Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*). Da diese einen niedrigen GC-Gehalt von unter 50 mol % aufweisen, werden sie dem Clostridium-Zweig zugeordnet (Schleifer und Ludwig, 1995). Diese Bakterien sind fakultativ anaerob, nicht sporulierend, unbeweglich, Katalase- und Oxidase-negativ. Sie betreiben zur Energiegewinnung eine homofermentative Milchsäuregärung und sind für ihre begrenzte Biosynthesefähigkeit bekannt. Für ihr Kultivierung wird daher ein semisynthetisches Komplexmedium (Lacks und Hotchkiss, 1960) verwendet, das sowohl eine Kohlenstoffquelle, als auch Aminosäuren, Pyrimidine, Purine, Cholinchlorid, und Vitamine enthält und den hohen Nährstoffanforderungen der Streptokokken somit gerecht wird. Das Wachstum dieser Bakterien auf Festmedium erfordert dagegen den Zusatz von Blut oder Serum (Hardie und Whitley, 1995). In Abb. 1.1 ist die kokkale Morphologie von *S. pneumoniae* zu sehen. Die Bakterienzellen haben einen Durchmesser von 0,5-1,5 μm und sind rund bis lanzettenförmige. Sie wachsen entweder an der Basis paarweise aneinander gelagert, was den ursprünglichen Name *Diplococcus pneumoniae* erklärt, oder in Ketten mit unterschiedlicher Länge.

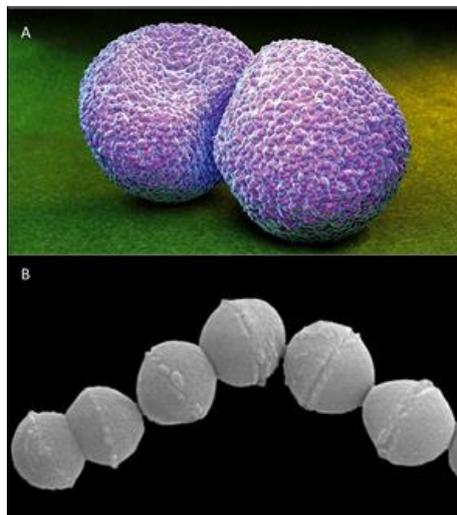


Abb. 1.1: Morphologie von *S. pneumoniae*. **A:** Zu sehen ist die typische diplokokkale Morphologie von *S. pneumoniae*. Quelle: Roger Harris/Science Photo Library, <http://www.sciencephoto.com/media/13055/enlarge>. **B:** Dargestellt ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Wachstums von *Streptococcus spec.* in kurzen Ketten. Quelle: http://www.ultrastruktur.bio.lmu.de/de/bilder/rem_sw/web_bilder_1/02_streptococcus_1.jpg

Streptokokken können anhand ihres unterschiedlichen Hämolyseverhaltens auf bluthaltigen, festen Kulturmedien differenziert werden (Brown, 1919). Dabei wird zwischen Streptokokken unterschieden, die entweder eine α -Hämolyse, eine β -Hämolyse (echten Hämolyse) oder eine γ -Hämolyse (keine Hämolyse) aufweisen. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *S. pneumoniae* gehört zu den α -hämolisierenden Streptokokken, da um die Bakterienkolonie eine Vergrünung des Mediums beobach-

tet wird, was auf eine partielle Veränderung und Entfärbung der Erythrozyten zurückzuführen ist. *S. pneumoniae* kann weiterhin aufgrund seiner Empfindlichkeit gegen Optochin (Bowers und Jeffries, 1955) von anderen vergrünenden Streptokokken abgegrenzt werden. Heutzutage werden zur Differenzierung unterschiedlicher *Streptococcus ssp.* neben physiologischen und morphologischen Methoden, vor allem moderne molekularbiologische Methoden, wie die MLST (Multi Locus Sequence Typing) bzw. MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) verwendet (Enright und Spratt, 1998; Hanage *et al.*, 2005).

Neben *S. pyogenes* und *S. agalactiae* zählt *S. pneumoniae* zu den wichtigsten humanpathogenen Streptokokken (Hardie und Whiley, 1995; Patterson, 1991), die in den Wirtsorganismen typische Infektionen hervorrufen. *S. pneumoniae* verursacht eine Vielzahl an unterschiedlichen Erkrankungen, angefangen bei relativ mild verlaufenden Formen wie beispielsweise die Mittelohrentzündung (Otitis media) und die Nasennebenhöhlenentzündung (Sinusitis), bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Sepsis, Lungenentzündung (Pneumoniae), eine bestimmte Form der Hirnhautentzündung (Meningitis), Bakteriämie und Herzinnenhautentzündung (Endokarditis) (Feldman und Klugman, 1997; Musher, 1992; Tomasz, 2000). Jährlich sterben weltweit über eine Millionen Menschen an den Folgen einer Pneumokokken-Erkrankung (1,6 Millionen Todesfälle laut WHO: Attali *et al.*, 2008). Pneumokokken-Infektionen finden sich dabei meist bei Menschen mit einem schwachen Immunsystem, daher gehören Kinder im Alter unter fünf Jahren und ältere, geschwächte oder bereits durch eine andere Krankheit vorbelastete Personen zu den Risikogruppen. Bei bis zu 60 % der Bevölkerung besiedeln die *S. pneumoniae* Bakterien die Schleimhäute des Nasopharynx, ohne dass sich Krankheitssymptome zeigen (Mitchell, 2003). Pathogene *S. pneumoniae* Stämme besitzen als Hauptvirulenzfaktor die Polysaccharidkapsel, die anti-phagozytisch wirkt (Jonsson *et al.*, 1985), da sie das Bakterium vor der Phagozytose durch Makrophagen des Immunsystems schützt und zusätzlich die Anheftung an das Wirtsgewebe verstärkt (Nelson *et al.*, 2007). Inzwischen sind weltweit 93 verschiedene Kapsel-Serotypen von *S. pneumoniae* bekannt und beschrieben (van Dam *et al.*, 1990; Bentley *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008; Bratcher *et al.*, 2010).

In der Geschichte der Mikrobiologie wurde das Bakterium *S. pneumoniae* 1928 durch Griffith's wegweisendes Experiment bekannt. Dem Bakteriologen Frederick Griffith gelang es anhand von Experimenten mit Pneumokokken zum ersten Mal die Transformierbarkeit des Hauptvirulenzfaktors dieser Bakterien, der Kapsel, nachzuweisen (Griffith, 1928). Später konnten Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty, anhand von eleganten Versuchen mit Pneumokokken, die DNA als Träger der genetischen Erbinformation identifizieren und damit die molekulare Grundlage der Transformation erklären (Avery *et al.*, 1944). Avery und seine Kollegen verwendeten für die Durchführung der Versuche neben den pathogenen, bekapselten Stamm auch den kapselfreien, apathogenen Stamm *S. pneumoniae* R36A (Avery *et al.*, 1944). Aus dem Stamm *S. pneumoniae* R36A wurden der ebenfalls unbekapselten Stamm *S. pneumoniae* R6 isoliert, der eine sehr hohe Transformierbarkeit aufwies (Hotch-

kiss, 1952; Ottolenghi und Hotchkiss, 1962). Dieser Stamm wurde innerhalb dieser Arbeit als Ausgangsstamm verwendet.

1.2 Penicillin-Bindeproteine in *S. pneumoniae* und β -Laktamantibiotika

1.2.1 Peptidoglykansynthese und Penicillin-Bindeproteine in *S. pneumoniae*

Die Zellwand, die den Bakterienzellen ihre Form verleiht, setzt sich in *S. pneumoniae* zu etwa gleichen Teilen aus Teichonsäuren und Peptidoglykan (Murein) zusammen (Mosser und Tomasz, 1970). Das Peptidoglykan liegt dabei als mehrlagige Schicht vor und stellt eine formgebende, spezifische und essentielle Komponente der Bakterienzellwand dar. Die Hauptfunktion dieses Makromoleküls besteht in der Aufrechterhaltung der Zellintegrität. Weiterhin ist Peptidoglykan an lebensnotwendigen Prozessen, wie dem Zellwachstum und der Zellteilung, beteiligt und fungiert für Proteine, Kapsel-Polysaccharide, Wand- und Lipoteichonsäuren als Gerüst zur Verankerung.

Peptidoglykan besitzt eine heteropolymere Struktur und setzt sich aus den Zuckerderivaten N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglukosamin-Einheiten und dem über die Laktylgruppe der N-Acetylmuraminsäure gebundenen Pentapeptid zusammen, die alternierend über β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Durch die zusätzliche Quervernetzung der Pentapeptidstränge erreicht das Peptidoglykan erst seine vollständige Stabilität. Das Pentapeptid setzt sich bei *S. pneumoniae* aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamin und zwei endständigen D-Alanin zusammen. Die Quervernetzung erfolgt dabei entweder über direkte Peptidbindungen oder über Interpeptidbrücken (L-Alanin-L-Serin oder L-Alanin-L-Alanin) (Vollmer, 2007 und die Referenzen). Das endständige D-Alanin des Pentapeptids wird abgespalten, was wiederum Energie für Transpeptidierungsreaktion liefert. Der Grad der Quervernetzung ist in diversen Pneumokokken-Stämmen unterschiedlich stark ausgeprägt, dabei weisen einige resistente Stämme ein stark verzweigtes Murein auf (Garcia-Bustos *et al.*, 1988; Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996).

Die Peptidoglykanbiosynthese ist ein komplexer Prozess, der sich aus mehreren Teilschritten zusammensetzt, in verschiedenen Kompartimenten der Zelle stattfindet und an dem über 20 verschiedene Enzyme beteiligt sind (Vollmer, 2007 und Referenzen). Grob lässt sich die Synthese in drei Schritte unterteilen, die im Zytoplasma, an der Zytoplasmamembran und an der Zellwand der Pneumokokken anlaufen. Im ersten Schritt der Peptidoglykansynthese wird im Zytoplasma in einer Reihe von Reaktionen das Molekül UDP-N-Acetylmuramin-Pentapeptid synthetisiert. Dieses Molekül wird zur Zytoplasmamembran transportiert und auf Undekaprenylphosphat (auch Bactoprenol), einem membrangebundenen Lipidcarrier übertragen. Dadurch wird das Lipid I gebildet (Scheffers und Pinho, 2005). Anschließend wird dieses mit N-Acetylglukosamin verknüpft, wobei das Lipid II entsteht. Zur Synthese der Interpeptidbrücke werden die entsprechenden Aminosäurereste durch Aminoacyl-Ligasen angefügt (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Das entstandene Disaccharid-Heptapeptid wird mit Hilfe eines noch ungeklärten „Flippase“-Mechanismus zur periplasmatischen Seite der Zytoplas-

mamembran transportiert (Bouhss *et al.*, 2008) und dort durch Transpeptidierungs- und Transglykosylierungsreaktionen, die durch die Penicillin-Bindeproteine katalysiert werden, in die Zellwand eingebaut (Bouhss *et al.*, 2008).

Die Abb. 1.2 A zeigt eine schematische Darstellung der Grundstruktur des Peptidoglykans in *S. pneumoniae*. Die durch Penicillin-Bindeproteine (PBPs) katalysierten Reaktionen der Zellwandbiosynthese sind dabei durch farbige Pfeile markiert. Die Transpeptidase-Aktivität (Abb. 1.2 A) ist für die Quervernetzung von glykangebundenen Peptidketten zuständig. Durch die Abspaltung des endständigen D-Alanins der Pentapeptidkette wird der Grad der Quervernetzung indirekt reguliert, da die Anzahl an Pentapeptid-Einheiten für die Transpeptidierung limitiert wird (Severin *et al.*, 1992; Morlot *et al.*, 2004). Für diese D,D-Carboxypeptidase Aktivität ist in *S. pneumoniae* das PBP3 zuständig (Abb. 1.2). Die Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b und 2a sind bifunktional und somit auch für die Transglykosylierung von N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin zuständig (Abb. 1.2).

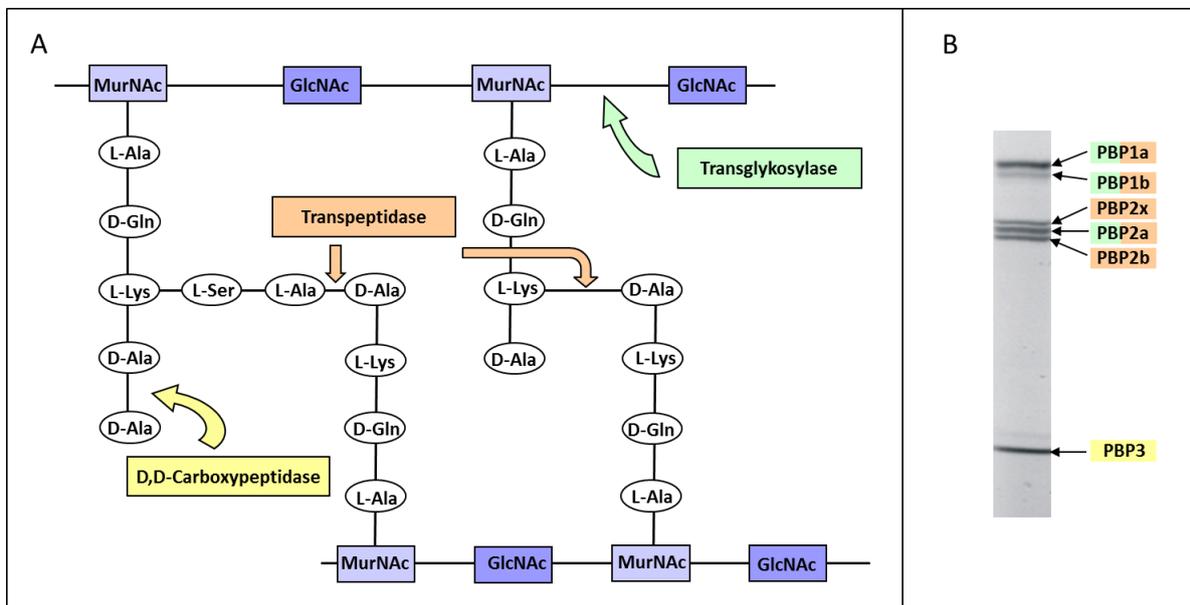


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Grundstruktur des Peptidoglykans in *S. pneumoniae* und die katalysierten Reaktionen der PBPs. **A:** Dargestellt ist das Rückgrat des Peptidoglykans, das aus den alternierenden Zuckerderivaten N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) besteht, die β -1,4 glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Quervernetzung der Peptidoglykanstränge erfolgt über Pentapeptide, die entweder über eine Interpeptidbrücke oder direkt miteinander verknüpft sind. Die drei Reaktionen, die von den PBPs katalysiert werden (Transpeptidierung, Transglykosylierung und D,D-Carboxypeptidierung) sind durch farbige Pfeile gekennzeichnet. **B:** Gezeigt ist ein Fluorogramm der sechs PBPs aus *S. pneumoniae* R6. Die Proteine wurden zuerst mit BocillinTM FL markiert anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anhand der Farben sind die Funktionen der einzelnen PBPs, die bereits in Abb. 1.2 B zu sehen sind, zu entnehmen.

Penicillin-Bindeproteine konnten in allen Eubakterien nachgewiesen werden, die in der Lage sind Peptidoglykan zu synthetisieren. Dabei verfügt jede Bakterienspezies über ein charakteristisches Set an PBPs. Penicillin-Bindeproteine können mit dem fluoreszierenden PenicillinV-Derivat BocillinTM FL oder einem anderen radioaktiven β -Laktam-Derivat markiert und somit in einem Fluorogramm sichtbar gemacht werden (Abb. 1.2 B). Die Nummerierung der Penicillin-Bindeproteine erfolgt in *S. pneumoniae* nach ihrem molekularen Gewicht in abnehmender Reihenfolge (Denapaitte *et al.*, 2007). Die

sechs verschiedenen PBPs, die *S. pneumoniae* besitzt (Hakenbeck *et al.*, 1986), werden anhand ihres Molekulargewichts und der Domänenstruktur in hochmolekulare (high molecular weight: hmw) PBP der Klasse A oder B, und niedermolekulare (low molecular weight: lmw) PBPs unterteilt (Goffin und Ghuysen, 1998; Goffin und Ghuysen 2002; Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008) (Abb. 1.3).

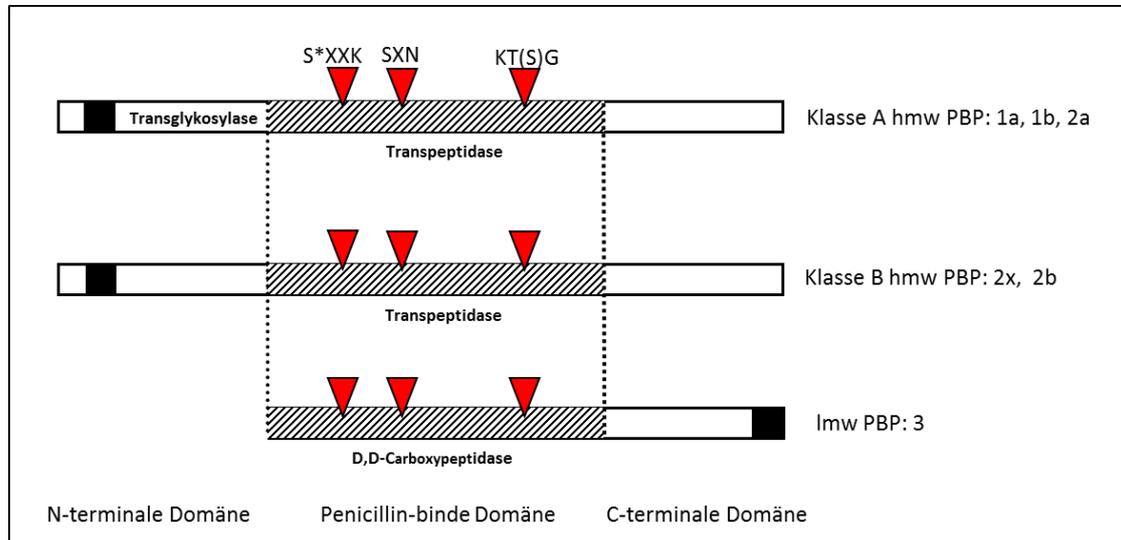


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der sechs Penicillin-Bindeproteine aus *S. pneumoniae*. Die Domänenstruktur der sechs PBPs aus *S. pneumoniae* wird durch Balken angedeutet. Die penicillin-bindende Transpeptidase-Domäne ist als schraffierter Balken dargestellt. Innerhalb dieser Domäne befinden sich die drei konservierten Aminosäuremotive S*XXK, SXK und K(T/S)G, die als rote Dreiecke gekennzeichnet sind. Das aktive Serin ist dabei mit * markiert und X steht für variable Aminosäuren. Der hydrophobe Transmembranbereich am N-Terminus der hmw PBPs, der als Membrananker fungiert, ist als schwarzes Quadrat gezeigt. Das lmw PBP3 besitzt dagegen eine amphiphile Helixstruktur am C-terminalen Ende, die dieses PBP an die Membran assoziiert. Diese ist ebenfalls als schwarzes Quadrat zu sehen. Die Vertreter der Klasse A und B hmw und lmw PBPs sind rechts angegeben. Alle sechs PBPs verfügen über eine Transpeptidase-Domäne. Die PBPs der Klasse A hmw besitzen zusätzlich eine N-terminale Transglykosylase-Domäne (nach Hakenbeck, 1998). Abk.: hmw: high molecular weight, lmw: low molecular weight, PBP: Penicillin-Bindeprotein.

Alle PBPs besitzen eine Penicillin-Binde Domäne, die wiederum drei konservierte Aminosäuremotive (Abb. 1.3) beinhaltet. Aufgrund dieser Homologieboxen und struktureller Gemeinsamkeiten werden die PBPs zusammen mit den β -Laktamasen in die Superfamilie der Acyl-Serin-Transferasen eingeteilt (Ghuysen, 1991). Die hmw PBPs sind über eine hydrophobe Membranregion am N-terminalen Ende in der Zytoplasmamembran verankert (Abb. 1.3). Des Weiteren besitzen sie eine kurze zytoplasmatische Region am N-Terminus und eine C-terminale Domäne.

Von den hmw PBPs der Klasse B PBP2x und PBPb ist bekannt, dass sie für *S. pneumoniae* essentiell sind, da Deletions- und Inaktivierungsversuche fehlschlagen (Kell *et al.*, 1993). Die hmw PBPs der Klasse A: PBP1a, PBP1b und PBP2a konnten dagegen einzeln deletiert werden. Bis auf das Paar *pbp1a/pbp2a* konnten auch Doppelmutanten erstellt werden (Paik *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass entweder PBP1a oder PBP2a für das Wachstum nötig ist (Paik *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 1999). Die *pbp2a*-Deletionsmutante wies weiterhin eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Moemycin aus. Daher wird angenommen, dass PBP2a die Haupt-Transglykosylase in Pneumokokken ist (Paik *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 1999). Die D,D-

Carboxypeptidase-Funktion des lmw PBP3 wurde anhand von *in vitro*-Experimenten bestätigt (Hakenbeck und Kohiyama, 1982).

Alle Promotoren der PBP-Gene werden mittelstark und über die gesamte Wachstumsphase konstitutiv exprimiert (Peters, 2009). Um die Funktion der einzelnen PBPs besser verstehen zu können, wurde für alle PBPs aus *S. pneumoniae*, bis auf PBP2a die Kristallstruktur aufgeklärt (Contreras-Martel *et al.*, 2009; Contreras-Martel *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2005; Morlot *et al.*, 2005; Pares *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde die Lokalisation aller hmw PBPs aus *S. pneumoniae* mittels Immunofluoreszenz analysiert (Morlot *et al.*, 2003; Zapun *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der aktuelleren Studien zeigten, dass sich alle PBPs innerhalb des Zellzyklus an der Zellmitte lokalisieren (Zapun *et al.*, 2008). Für das lmw PBP3 wurde mittels Immunogoldmarkierung mit anti-PBP3-Antikörpern eine Lokalisation über die komplette Oberfläche der Zelle (Hakenbeck *et al.*, 1993), jedoch kein Signal am Zellseptum nachgewiesen. Daher wird für PBP3 die Funktion der Koordination des Zellteilungsprozesses und die Platzierung der Teilungsebene vermutet (Morlot *et al.*, 2004). Aufgrund der aktuellen Datenlage wird für das Wachstum von *S. pneumoniae* ein Modell postuliert, laut dem sowohl septale, als auch periphere Peptidoglykansynthese ausgehend von der Zellmitte stattfindet. Dabei sind die essentiellen Zellteilungsproteine in der Neugestaltung des Peptidoglykans involviert, wobei die Proteine, die die Peptidoglykanbiosynthese organisieren, sich an der Zellmitte lokalisieren und einen Translokationsapparat formen (Zapun *et al.*, 2008; Sham *et al.*, 2012).

1.2.2 β -Laktamantibiotika und ihre Wirkungsweise

Zur Behandlung von Infektionskrankheiten, deren Ursache Pneumokokken sind, werden hauptsächlich β -Laktamantibiotika, wie z. B. Penicillin verwendet. Die bakteriozide Wirkungsweise der β -Laktamantibiotika beruht auf der Inhibierung der Transpeptidierungs- und Carboxypeptidierungsreaktionen, die von den Penicillin-Bindeproteinen katalysiert werden. β -Laktame fungieren aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem Dipeptidrest D-Alanyl-D-Alanin der zu verknüpfenden Pentapeptide, dem natürlichen Substrat der PBPs, als Strukturanaloga. Sie binden nach der Öffnung des β -Laktamrings kovalent an den Hydroxylrest des Serins im aktiven Zentrum der Transpeptidase-Domäne des PBPs. Dabei entsteht ein langlebiger, stabiler und enzymatisch inaktiver Acyl-Enzym Komplex (Cepalosporyl- bzw. Penicillolyl-Enzym Komplex), der für die Peptidoglykansynthese, speziell der Quervernetzung, nicht mehr zur Verfügung steht (Tipper und Strominger, 1965).

1.2.3 β -Laktam-Resistenz in *S. pneumoniae*

Das humanpathogene Bakterium *S. pneumoniae* galt lange Zeit als eines der penicillin-sensitivsten Mikroorganismen überhaupt (Hakenbeck *et al.*, 2012) und mit Hilfe von β -Laktamantibiotika schien die lebensbedrohliche Gefahr, die von den Pneumokokkeninfektionen ausgeht, gebannt zu sein. So kam es, dass erste Berichte von Penicillin-resistenten Labormutanten (Erikse, 1945; McKee und Houck, 1943) und Berichte von Labormutanten in *S. pneumoniae*, die sogar eine über 1000fach ange-

stiege Resistenz gegenüber Benzylpenicillin aufwiesen (Gunnison *et al.*, 1968), nicht ernst genommen wurden. Auch erste Berichte von ersten resistenten klinischen *S. pneumoniae* Isolaten in Australien und Neuguinea (Kislak *et al.*, 1965; Hansman, 1975) wurden noch nicht als bedrohlich angesehen. Kennzeichnend für die Resistenzentwicklung in *S. pneumoniae* war das Jahr 1978, als in einem Krankenhaus im südafrikanischen Johannesburg innerhalb kurzer Zeit mehrere Stämme auftraten, die neben einer hohen Penicillin-Resistenz auch eine Multiresistenz aufwiesen (Jacobs *et al.*, 1978). Seit Beginn der 80er Jahre wurden weltweit mit steigender Häufigkeit multiresistente *S. pneumoniae* Stämme isoliert, wobei die Resistenzniveaus anstiegen (Klugmann, 1990). Dies stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar.

In Pneumokokken wird die Resistenz gegenüber β -Laktamantibiotika durch Modifikationen in den Zielenzymen, den Penicillin-Bindeproteinen, hervorgerufen (Hakenbeck, 1995). Diese Modifikationen befinden sich innerhalb der Transpeptidase-Domäne und verringern die Affinität der PBPs gegenüber β -Laktamen (Hakenbeck *et al.*, 2012). Die veränderten PBPs werden mit dem Begriff niederaffin bezeichnet, da entweder gar keine oder nur eine schwache Bindung stattfindet. In Piperacillin- bzw. Cefotaxim-resistenten Labormutanten und in klinischen Isolaten konnten jeweils unterschiedliche Kombinationen an niederaffinen PBPs ausfindig gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass alle sechs PBPs zu solchen niederaffinen Formen verändert werden können (Hakenbeck *et al.*, 2012). Bei *S. pneumoniae* Stämme, die modifizierte und niederaffinen PBPs besitzen, wird eine höhere Konzentration an β -Laktamantibiotika benötigt, um das Wachstum zu inhibieren. Die Rolle der Penicillin-Bindeproteine bei der Resistenz gegenüber β -Laktamantibiotika ist bereits gut untersucht (Laible *et al.*, 1991; Spratt, 1994; Tomasz und Muñoz, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Denapaité *et al.*, 2007; Hakenbeck *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Penicillin-Bindeproteine PBP2x und PBP2b primären Targets vieler β -Laktamantibiotika darstellen und deshalb im Zuge der Resistenzentwicklung zuerst modifiziert werden. (Grebe und Hakenbeck, 1996; Denapaité *et al.*, 2007). Treten Veränderungen in diesen PBPs alleine auf, vermitteln sie nur geringe Resistenzen. Auch PBP1a ist bei der Antibiotikaresistenz involviert (Muñoz *et al.*, 1992; Smith und Klugman, 1998). Wenn PBP2x und PBP2b in modifizierter niederaffiner Form vorliegen, vermittelt PBP1a als sekundäre Resistenzdeterminante hohe Resistenzniveaus in *S. pneumoniae* Stämmen (Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1992; Barcus *et al.*, 1995). PBP2a besitzt eine relativ geringe Affinität gegenüber Penicillinen. Dennoch konnten niederaffine Formen von PBP2a im Labormutanten und auch in klinischen Isolaten in Zusammenhang mit einem niederaffinen PBP2x nachgewiesen werden (Du Plessis *et al.*, 2000; Hakenbeck *et al.*, 1998; Sanbongi *et al.*, 2004), allerdings ist die Rolle des PBP2a bei der β -Laktam-Resistenzentwicklung noch weitestgehend unklar.

Die Arten der Mutationen, die β -Laktam-Resistenz vermitteln, unterscheiden sich in Labormutanten und in klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* (Denapaité *et al.*, 2007). Bei β -Laktam-resistenten Labormutanten werden in der Transpeptidase-Domäne der PBPs vereinzelt Punktmutationen nachgewiesen (Laible und Hakenbeck, 1991; Krauß *et al.*, 1996). Dagegen zeichnen sich die Gene der PBPs in

resistenten klinischen Isolaten durch Mosaikstrukturen aus, die durch Gentransfer und homologe Rekombination innerhalb von verwandten Arten entstehen. Der veränderte Sequenzbereich, der Resistenz verleiht, unterscheidet sich bis zu 25 % von der Sequenz des sensitiven Wildtyps (Dowson *et al.*, 1989a; Dowson *et al.*, 1989b; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992). Durch die natürlichen Kompetenz von *S. pneumoniae* wird die Ausbreitung von β -Laktam-resistenten Stämmen verstärkt und durch horizontalen Gentransfer und homologe Rekombination kann es zudem leicht zur Entstehung von multiresistenten Stämmen kommen.

Neben der beschriebenen, PBP-vermittelten β -Laktam-Resistenz wurde in resistenten *S. pneumoniae* Stämmen auch nicht-PBP-vermittelte Mechanismen nachgewiesen, die zur β -Laktam-Resistenz führen. Dabei werden Gene modifiziert, die nicht für PBPs kodieren. Als erste nicht-PBP Resistenzdeterminante wurde die Histidinkinase CiaH des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in Labormutanten identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994). In Laborstämmen, die ausgehend von *S. pneumoniae* R6 mit dem Antibiotikum Piperacillin sukzessiv selektioniert wurden, konnte Mutationen in dem Gen *cpoA* (regulator of competence and PonA), das für eine Glykosyltransferase kodiert, aufgefunden werden. Es wurde gezeigt, dass diese zur Resistenzhöhung gegenüber Piperacillin führen (Grebe *et al.*, 1997). In diesen Mutanten wurde neben einer Reduktion der natürlichen Kompetenz auch eine verringerte PBP1a Menge beobachtet.

In klinischen Isolaten ist MurM, ein Enzym, das für die Anheftung der ersten Aminosäure der Interpeptidbrücke zuständig ist, als weitere nicht-PBP Resistenzdeterminante bekannt. Modifikationen in MurMN führen dabei zur Entstehung von hohen Resistenzen (Filipe und Tomasz, 2000). Des Weiteren wurde MurE, die als Aminosäure-Ligase fungiert und bei der Zellwandbiosynthese eine Rolle spielt, als eine weitere nicht-PBP Resistenzdeterminante identifiziert (Todorova, 2010).

1.3 Das essentielle Penicillin-Bindeprotein 2x aus *S. pneumoniae*

In der Mitte der 80er Jahren wurde PBP2x als letztes der sechs PBPs ins *S. pneumoniae* entdeckt (Hakenbeck *et al.*, 1986). Das Gen, das für PBP2x kodiert, liegt zusammen mit zwei stromaufwärts liegenden Genen *yllC*, *ftsL* und dem stromabwärts liegenden *mraY* ein Operon, das als *dew* (division and cell wall) - Cluster bezeichnet wird (Massidda *et al.*, 1998). PBP2x ist ein 750 Aminosäuren langes, monofunktionales Enzym mit einem Molekulargewicht von 82,3 kDa. Seine dreidimensionale Struktur wurde von allen PBPs zuerst aufgeklärt (Pares *et al.*, 1996; s. Abb. 1.4). Es besitzt eine kurze zytoplasmatische Region (AS 1-28) und ist über eine Transmembranregion (TM: AS 29-49) mit der Zytoplasmamembran verankert. Daran schließt eine N-terminale Domäne unbekannter Funktion an (AS 49-265; graue Farbe), die eine verlängerte „Zucker-Zangen“ Form (Gordon *et al.*, 2000; Pares *et al.*, 1996) zeigt. Die Funktion dieser Domäne ist bisher noch unbekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass PBP2x als Teil eines großen Multienzym Komplexes (Divisoms) vorliegt, wobei PBP2x zu den Proteinen zählt, die das Divisom zu einem späteren Stadium erreichen (Morlot *et al.*, 2003, Zapun *et al.*, 2008; Fadda *et al.*, 2007). Aufgrund der speziellen Struktur der N-terminalen Domäne des PBP2x

Proteins wird vermutet, dass diese mit andern Proteinen des Divisoms interagiert (Höltje, 1998; Massidda *et al.*, 1998). Des Weiteren wurden in resistenten Stämmen im Inneren dieser Struktur nur wenige Mutationen ausfindig gemacht, was wiederum die Annahme bestärkt, dass es sich hierbei um eine wichtige Kontaktregion zwischen Proteinen handelt (Dessen *et al.*, 2001)

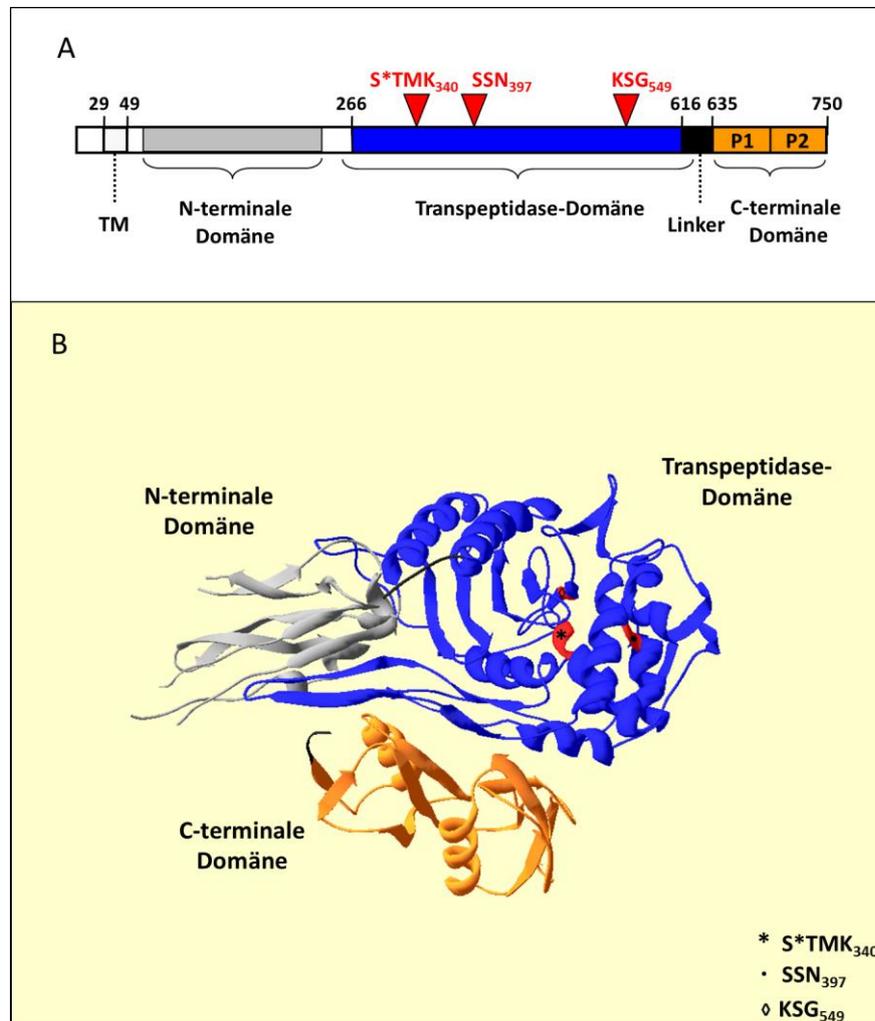


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau und dreidimensionale Struktur des PBP2x aus dem sensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6. **A:** Der Aufbau des 750 Aminosäuren (AS) langen PBP2x ist schematisch dargestellt. Das Protein besitzt eine zytoplasmatische Region (AS: 1-28) und einen Transmembrananker (TM: AS 29-49). Des Weiteren weist das PBP2x eine Drei-Domänenstruktur auf. Die N-terminale Domäne (AS 71-249) ist in grauer Farbe gezeigt. Nach einer Linkerregion folgt (weiß) die penicillin-bindende Transpeptidase-Domäne (AS 266-616, blau dargestellt). Innerhalb dieser Domäne sind die drei konservierten Boxen S*TMK₃₄₀, SSN₃₉₇ und KSG₅₄₉ (als rote Dreiecke markiert) lokalisiert. Über eine Linkerregion (AS 617-634, schwarze Box) ist die C-terminale Domäne, die wiederum zwei PASTA-Domänen ($\alpha/\beta/\beta$ Motive) beinhaltet (P1: AS 635-691, P2: 692-750, orange Farbe), mit der Transpeptidase-Domäne verbunden. Die PBP2x-Struktur wurde nach Gordon *et al.*, (2000) und Dessen *et al.*, (2001) erstellt. **B:** In der gezeigten Kristallstruktur sind die bereits erwähnten, einzelnen Domänen farblich dargestellt. Die Farben entsprechen dabei denen aus Abb. 1.4 A. Die dreidimensionale Struktur des PBP2x wurde mit dem Programm SwissPdbViewer, Version 4.1 und der Strukturdatei mit der Proteinbanknummer 1QMF (Gordon *et al.*, 2000) erstellt.

Die N-terminale Domäne ist eng mit der zentralen penicillin-bindenden Transpeptidase-Domäne (s. Abb. 1.4) verbunden. Laut Pares *et al.*, 1996 befindet sich das aktive Zentrum von PBP2x in der Mitte einer langen Furche, die bisher in keinem anderen Penicillin-erkennenden Enzym nachgewiesen wer-

den konnte. Über einen flexiblen Loop, der Linkerregion, ist die Transpeptidase-Domäne mit der globulären C-terminalen Domäne verbunden, die zwei PASTA-(penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated) Domänen beinhaltet (s. Abb. 1.4: P1 und P2), die wohlmöglich durch Gen-Duplikation entstanden sind (Yeats *et al.*, 2002). Für die vier extrazellulären PASTA-Domänen der Serin/Threonin-Kinase StkP aus *S. pneumoniae* wurde die Erkennung und Bindung von unverknüpften Peptidoglycan erstmal experimentell nachgewiesen (Maestro *et al.*, 2011). Trotz ihrer geringen Ähnlichkeit auf Aminosäuresequenzebene, wird für die PASTA-Domänen von PBP2x eine ähnliche Funktion vermutet (Jones und Dyson, 2006); auch wurde in einer Kristallstruktur ein nicht-kovalentes Cefuroxim, also ein Strukturanalog des Muropeptides, aufgefunden, das an der ersten PASTA-Domäne über Van-der-Waals-Kräfte assoziiert war (Yeats *et al.*, 2002). Tatsächlich ist die Anwesenheit der α -Helix der zweiten PASTA-Domäne von PBP2x für die Bindung von β -Laktam notwendig (Maurer *et al.*, 2012).

1.3.1 Das grün fluoreszierende Protein GFP und GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte

Das Phänomen der Biolumineszenz, bei dem in lebenden Organismen durch enzymatische Reaktionen Licht erzeugt wird (Veith und Veith, 2005), findet sich in zahlreichen Coelenteraten. Die grün fluoreszierende Pazifikqualle *Aequorea victoria* weist diese Fähigkeit ebenfalls auf. Shimomura *et al.*, 1962 gelang es das Photoprotein Aequorin aus dieser Qualle zu isolieren und zu charakterisieren. Es wurde festgestellt, das Aequorin blaues statt grünes Licht ausstrahlt, sobald es aktiviert wird und dass diese ausgestrahlte Energie wiederum zur Anregung eines weiteren Fluoreszenzproteins nötig ist. Dieses Protein emittiert, sobald es angeregt wird grünes Licht und wurde deshalb GFP (grün fluoreszierendes Protein) genannt (Shimomura *et al.*, 1962; Johnson *et al.*, 1962). In Abb. 1.5 ist die dreidimensionale Struktur des Wildtyp-GFP nach Yang *et al.*, 1996 zu sehen.

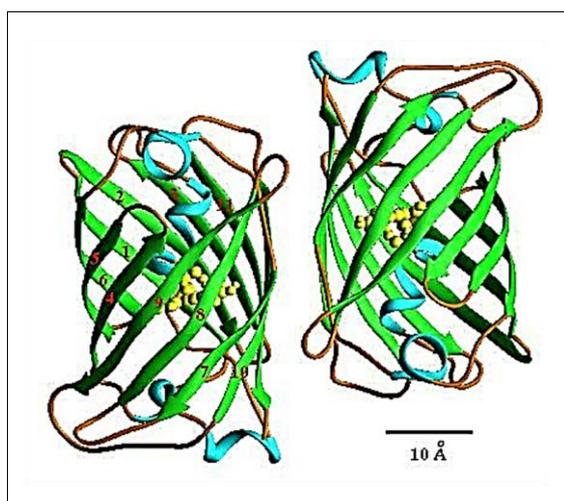


Abb. 1.5: Dreidimensionale Struktur des Wildtyp-GFP. Die zylinderförmige β -Can-Struktur besteht aus 11 β -Faltblättern (■), die die Wand des Zylinders ausbilden. Der Zylinder hat einen Durchmesser von $\sim 30\text{\AA}$ und eine Länge von $\sim 40\text{\AA}$. Das Fluorophor (■) ist auf einer zentralen α -Helix (■), in der Nähe des geometrischen Zentrums dieser Struktur lokalisiert. Kleinere α -helikale Struktursegmente formen die Deckel an den Enden der zylinderförmigen β -can-Struktur (aus Yang *et al.*, 1996).

Das GFP-Protein besteht aus 11 β -Faltblattblättern, die neun bis elf Aminosäuren enthalten und eine zylinderförmige β -Can-Struktur ausbilden (Yang *et al.*, 1996; Ormö *et al.*, 1996). Dabei liegen die β -Faltblätter eng bei einander und bilden ein regelmäßiges Muster aus Wasserstoffbrückenbindungen

aus. Im Inneren dieser Struktur und damit gut geschützt, befindet sich auf einer zentralen α -Helix das Fluorphor, das aus den drei Aminosäuren S65-Y66-G67 besteht. Diese drei Aminosäuren sind Teil desselben Proteins. Das GFP kann sich bemerkenswerterweise völlig selbstständig in seine funktionsfähige Form falten, wobei keine Cofaktoren benötigt werden.

Im Jahre 1992 begann die einmalige und rasante Karriere der fluoreszierenden Proteine mit der erstmaligen Klonierung der cDNA des GFP (Prasher *et al.*, 1992). Zwei Jahre später gelang es Chalfie *et al.* bereits GFP in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zum Leuchten zu bringen (Chalfie *et al.*, 1994). Im Jahr 2008 erhielt Martin Chalfie gemeinsam mit Osamu Shimomura und Roger S. Tsien dafür den Nobelpreis für Chemie. Seitdem ist GFP in der Biologie von unschätzbarem Wert, da mit Hilfe seiner Fluoreszenz faszinierende Experimente durchgeführt werden können. Begründet durch die fehlende Zytotoxizität des GFPs, ist es möglich die Lokalisation anderer Proteine in lebenden Zellen mit Hilfe dieses Proteins zu untersuchen. Hierfür wird GFP zuvor mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert.

In mikroaerophilen Bakterien wie *S. pneumoniae* wird die Verwendung von GFP aufgrund der post-translationalen Oxidation von GFP durch Sauerstoff als schwierig angesehen (Acebo *et al.*, 2000). Jedoch konnte die erfolgreiche Genexpression von *gfp* und die vollständige Aktivität des gefalteten GFPs bei pH-Werten zwischen 6,0 und 9,5 nachgewiesen werden (Acebo *et al.*, 2000). Innerhalb dieser Arbeit wurde mit GFP⁺ (nachfolgend als GFP bezeichnet), einer verbesserten Variante von GFP, gearbeitet, die in der Lage ist sich schneller zu falten (Eberhart *et al.*, 2009). GFP⁺ weist aufgrund zahlreicher Modifikationen eine 130fach gesteigerte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu dem Wildtyp-GFP auf und die Empfindlichkeit ist für die Detektion in der Zelle im Vergleich zum Wildtyp-GFP ist um ca. 320fach höher (Schloz *et al.*, 2000).

Um die Lokalisation von PBP2x in lebenden *S. pneumoniae* Zellen untersuchen zu können, wurden ein N-terminales GFP-PBP2x-Fusionsprotein erstellt, wobei am 3'-Ende von *gfp* eine Sequenz für eine Linkerregion kodiert (Stahlmann, 2011). Die Transkription des *gfp*-Fusionsgens stand dabei unter der Kontrolle des zinkinduzierbaren Promotors P_{czcD}. Dieses verwendete zinkinduzierbare System wurde bereits für die genaue Regulierung der Expression von *gfp*-Fusionsgenen und für Protein Depletionsexperimente in *S. pneumoniae* etabliert (Eberhardt *et al.*, 2009). Das Proteinprodukt des Gens *czcD* wurde bereits als Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* identifiziert, da es die Bakterien gegen toxische Zn²⁺ Konzentrationen schützt (Kloosterman *et al.*, 2007). Weiterhin wurde SczA als transkriptioneller Regulator identifiziert, der die Expression des Promotor P_{czcD} in Abwesenheit von Zn²⁺ reprimiert und in Anwesenheit von Zn²⁺ (Co²⁺ und Ni²⁺) aktiviert (Kloosterman *et al.*, 2007). Aufgrund dieser gut untersuchten Tatsache konnte der Promotor P_{czcD} als zinkinduzierbarer Promotor für diese Studie verwendet werden.

Das GFP-PBP2x Fusionsprotein wies eine septale, von Zellzyklus abhängige Lokalisation auf (Stahlmann, 2011) und bestätigte die von Morlot *et al.*, 2003 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelten Ergebnisse (Abb. 1.6). Das Fusionsprotein GFP-PBP2x war in der Lage mit BocillinTMFL zu

interagieren, und die essentielle Funktion von PBP2x zu übernehmen. (Stahlmann, 2011). Für die korrekte Lokalisation von PBP2x am Septum ist offenbar die Transpeptidasefunktion nicht notwendig, da das enzymatisch inaktive GFP-PBP2x_{S337A} Fusionsprotein dieselbe Lokalisation wie das Wildtypprotein aufwies (Breckner, 2012; Abb. 1.6).

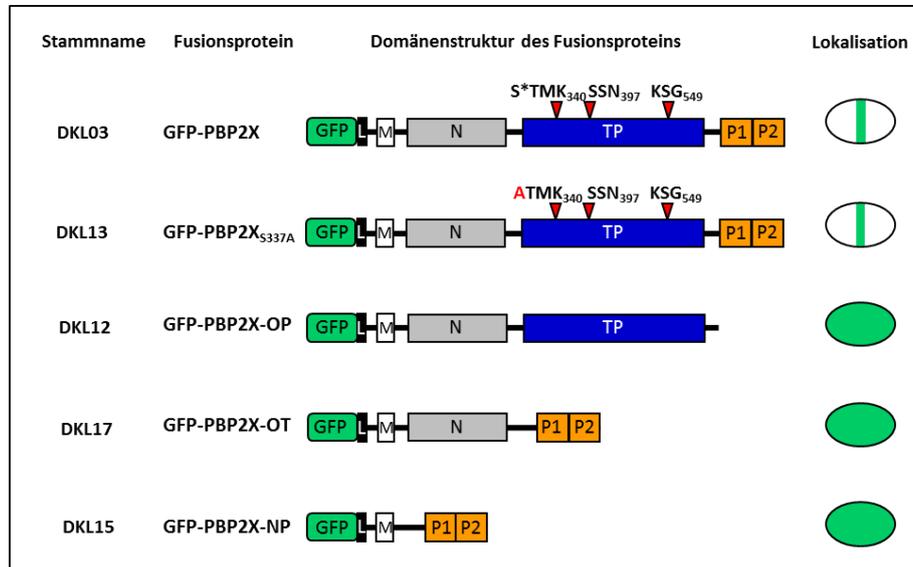


Abb. 1.6: Aufbau diverser GFP-PBP2x-Fusionsproteine und deren ermittelte Lokalisation. Dargestellt sind die Domänenstrukturen verschiedener GFP-PBP2x-Fusionsproteine der Stämme DKL03 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*), DKL13 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*_{S337A}), DKL12 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*OP, Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750), DKL17 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*OT, interne Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616), DKL15 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*NP, interne Deletion in PBP2x von AS T56 bis D616). Die GFP-Domäne ist als grüner Balken dargestellt, die über eine Linkerregion (schwarze Box, L) mit dem N-Terminus des PBP2x verbunden ist. Die Transmembrandomäne von PBP2x wird durch einen weißen Kasten (M) symbolisiert. Die N-terminale Domäne (AS 71-249; N) ist in grauer Farbe gezeigt. Die penicillin-bindende Transpeptidase-Domäne (TP; AS 266-616) ist in blau dargestellt. Innerhalb dieser Domäne sind die drei konservierten Boxen S*TMK₃₄₀, SSN₃₉₇ und KSG₅₄₉ (als rote Dreiecke markiert) lokalisiert. Die C-terminale Domäne, besteht aus zwei PASTA-Domänen (AS 635-691, 692-750; P1 und P2, orange Farbe). Modifiziert nach Peters *et al.*, 2013 (Veröffentlichung in Vorbereitung). Das jeweils ermittelte Lokalisationssignal der unterschiedlichen GFP-PBP2x-Fusionsproteine ist in der schematisch dargestellten Zelle in grüner Farbe gezeigt (rechts).

Lokalisationsstudien mit GFP-StkP Fusionskonstrukten offenbarten, dass StkP aus *S. pneumoniae* sich aufgrund seiner PASTA-Domänen in der Zellmitte lokalisiert (Beilharz *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2012). Dabei wird die Lokalisation von StkP in *S. pneumoniae* durch die Erkennung des unverknüpften Peptidoglykans durch die PASTA-Domänen zu den Zellteilungszonen gelenkt (Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob die zwei PASTA-Domänen aus PBP2x für die korrekte septale Lokalisation dieses Proteins benötigt werden, wurde ein Satz aus N-terminalen GFP-PBP2x Fusionskonstrukten erstellt, in denen jeweils unterschiedliche Deletionen in PBP2x vorlagen (Abb. 1.6). Fluoreszenzmikroskopische Analysen des Stamms DKL12, der das GFP-PBP2x-OP (OP: ohne PASTA) Fusionsprotein synthetisiert, zeigten, dass das Signal des Fusionsproteins im Zytoplasma der kompletten Zelle verteilt war (Schweizer, 2011). Demnach war, sobald die PASTA-Domänen fehlten eine korrekte Lokalisation des PBP2x nicht möglich (Schweizer, 2011; Abb. 1.6). Mit Hilfe der Stämme DKL17 und DKL15 sollte geklärt werden, ob die PASTA-Domänen unabhängig von der

Transpeptidase-Domäne bzw. unabhängig von der Transpeptidase- und N-terminalen Domäne für die Lokalisation des PBP2x am Zellseptum verantwortlich sind. Der hergestellte Stamm DKL17 synthetisiert nach der Induktion mit Zink das Fusionsprotein GFP-PBP2x-OT (OT: ohne Transpeptidase-Domäne). In diesem Fusionsprotein sind die beiden PASTA-Domänen aus PBP2x an die N-terminale Domäne fusioniert und die zentrale Transpeptidase-Domäne in PBP2x deletiert (Breckner, 2012). Der Stamm DKL15 beinhaltet dagegen das Fusionskonstrukt GFP-PBP2x-NP (NP: nur PASTA; Breckner, 2012). Dieses Fusionsprotein besteht lediglich aus der Transmembrandomäne und den beiden PASTA-Domänen; sowohl die Transpeptidase, als auch die N-terminale Domäne fehlen. Die Lokalisationsstudien zeigten in beiden Fällen eine Fluoreszenz der gesamten Zelle. Entgegen der Erwartungen konnte eine Akkumulation des Proteins am Zellseptum nicht detektiert und die postulierte These mit Hilfe dieser Konstrukte nicht zusätzlich bestätigt werden (Breckner, 2012).

1.4 Das Zwei-Komponenten System CiaRH

In dem humanpathogenen *S.* wurden 13 Zwei-Komponenten Systeme und ein Response Regulator nachgewiesen (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Zwei-Komponenten Systemen stellen Regulationssysteme dar, mit deren Hilfe Bakterienzellen in der Lage sind, mit ihrer Umwelt zu kommunizieren und sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen.

Das regulatorische Zwei-Komponenten System CiaRH wurde als erstes Zwei-Komponenten System in *S. pneumoniae* beschrieben. Die Abkürzung Cia steht für „competence induction and altered cefotaxime susceptibility“ (Guenzi *et al.*, 1994), da Mutationen in CiaH zu erhöhter Resistenz gegenüber Cefotaxime führen und sich negativ auf die Entwicklung der genetischen Kompetenz auswirken. Die Gene *ciaH* und *ciaR*, die für diese Zwei-Komponenten System kodieren, werden als Operon transkribiert (Giammarinaro *et al.*, 1999) und überlappen um 8 bp.

Es konnte gezeigt werden, dass der T230P-Austausch (*ciaH*306) innerhalb der Histidinkinase CiaH, zu einer erhöhten β -Laktam-Resistenz und zum Verlust der genetischen Kompetenz von *S. pneumoniae* führt. Des Weiteren konnte eine von dieser Veränderung ausgehende Aktivierung des Systems nachgewiesen werden, die die transkriptionelle Regulation durch den Response Regulator CiaR verstärkt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b). In weiteren Studien wurden sieben unterschiedliche *ciaH*-Allele, die zuvor in Labormutantenstämmen selektioniert wurden, in den genetischen Hintergrund des sensitiven Stamms *S. pneumoniae* R6 gebracht und die Auswirkungen auf die β -Laktam-Resistenz untersucht. Dabei zeigte sich für diese Stämme eine, im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6, erhöhte Resistenz gegenüber den β -Laktamantibiotika Cefotaxim und Oxazillin, wobei die Resistenzen mit der jeweiligen Aktivierungsstärke des CiaRH-Systems korrelieren und von dieser abhängig sind (Müller *et al.*, 2011). In einem klinischen Isolat, dem vancomycintoleranten Stamm Tupelo, wurde 2010 erstmal ebenfalls ein verändertes *ciaH*-Allel nachgewiesen, das an der Ausbildung des Vancomycin-toleranten Phentyps beteiligt ist (Moscoso *et al.*, 2010). Im Rahmen einer weiteren Arbeit wurde dieses *ciaH*-Allel in den genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6

gebracht und untersucht. Dabei konnte ein Anstieg der β -Laktam-Resistenz, der allein auf dieses klinische *ciaH*-Allel zurückzuführen ist, beobachtet werden (Marx, 2013).

Neben der Beteiligung an der Kompetenz und an der β -Laktam-Resistenz wurde in unterschiedlichen Studien belegt, dass das CiaRH-System in *S. pneumoniae* auch bei der Bakteriozinproduktion involviert (Dawid *et al.*, 2009, Kochan und Dawid, 2013) und an der Virulenz (Throup *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2004a, b) beteiligt ist. Die Inaktivierung des CiaRH-Systems wirkt sich negativ auf die Virulenz aus (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a; Throup *et al.*, 2000).

Die Zielgene dieses Systems sind anhand von Transkriptomstudien beschrieben (Sebert *et al.*, 2002; Heintz, 2006; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Anhand von *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnten schließlich 15 Promotoren identifiziert werden, die direkt durch den Response Regulator CiaR kontrolliert werden (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Promotoren der Zielgene, die durch CiaR reguliert werden, besitzen nachgewiesenermaßen einen direkten Repeat der Sequenz TTTAAG-N5-TTTAAG, der meist 10 bp stromaufwärts der -10 Region lokalisiert ist (Halfmann *et al.*, 2007b). Diese Sequenz ist das Bindemotiv von CiaR. CiaR kontrolliert dabei 15 Promotoren direkt, die wiederum die Transkription von 24 Genen steuern. Diese Gene sind in fünf Operons und 10 monocistronischen Einheiten organisiert (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011). Bis auf den Promotor des *manLMN*-Operons, werden alle Promotoren der identifizierten Zielgene positiv durch CiaR reguliert. Die Zielgene, die durch CiaR reguliert werden, lassen sich einteilen in Gene, deren Transkription strikt von CiaR reguliert wird und solche, bei denen die Transkription neben CiaR von anderen zusätzlichen Faktoren abhängt (Halfmann *et al.*, 2007b). Zu den strikt von CiaR regulierten Genen zählt das Gen *spr0931*, *parB*, *htrA* und die kleinen, nicht kodierenden, regulatorischen RNAs (csRNAs), die eine Größe von 87 bis 151 Nukleotiden aufweisen (Halfmann *et al.*, 2007b). Das Gen *htrA* kodiert für die Serinprotease HtrA und *parB* für eine Chromosomen-Segretationsprotein. Das Operon *ciaRH* wird selbst durch den Response Regulator CiaR reguliert. Daneben werden unter anderem Gene kontrolliert, deren Produkte am Zucker und Zellwandmetabolismus beteiligt sind. Auch das Gen *axeI*, das für eine Acetyltransferase Axe kodiert, wird auf diese Weise reguliert. Das Signal, das das CiaRH-System in *S. pneumoniae* detektiert und stimuliert, ist bisher noch unbekannt.

1.5 Die Serinprotease HtrA

Hinter dem Namen HtrA, der für high temperature requirement A steht, verbirgt sich eine Familie der Serinproteasen. Sie bildet die Kerngruppe an Proteasen; diese sind sowohl in Pro-, als auch in Eukaryonten weit verbreitet (Page und Di Cera, 2008; Clausen *et al.*, 2011). Die Klassifizierung der HtrA Proteine erfolgt anhand ihrer Homologie auf AS-Ebene und anhand der Faltung der Proteine (Rawlings *et al.*, 2010). Laut der MEROPS Nomenklatur werden HtrA-Proteasen der S1B Unterfamilie des PA Klans zugeordnet (Rawlings *et al.*, 2008).

In Bakterien befinden sich die HtrA-Proteine extrazellulär bzw. im Periplasma. Die periplasmatische Serinprotease DegP aus *E. coli* wurde von Swamy *et al.*, 1983 als erste HtrA-Protease entdeckt. Dabei

handelt es sich um eine durch Hitzeschock induzierte Serinprotease, die sich an der periplasmatischen Seite der inneren Membran befindet (Pallen und Wren, 1997). Neben DegP wurden in *E. coli* die HtrA Proteine DegS und DegQ identifiziert und ebenfalls eingehend charakterisiert (Alba *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 2011). Die HtrA-Proteine der Prokaryoten sind nachweislich bei der Hitzeschockantwort involviert; weiterhin tragen sie zur Toleranz gegen extreme Bedingung, wie beispielsweise erhöhte Wachstumstemperaturen oder einen ansteigenden oxidativen oder osmotischen Stress (Skórko-Glonek *et al.*, 1999; Onder *et al.*, 2008; Skórko-Glonek *et al.*, 1995; Alba und Gross, 2004) bei. HtrA Proteine sind für die Protein-Qualitätskontrolle wichtig, da sie in der Lage sind falsch gefaltete Proteine abzubauen und dadurch den Stress, der von falsch gefalteten Proteinen ausgeht, zu reduzieren. Im Gegensatz zu anderen Serinproteasen sind die HtrA-Proteasen dazu in der Lage ihre katalytische Aktivität sowohl an, als auch abzuschalten (Clausen *et al.*, 2011). Zudem führen diese Proteasen ihre Funktion unabhängig von ATP durch (Clausen *et al.*, 2002; Kim und Kim, 2005). HtrA ist in Bakterien auch als bifunktionales Zellstressenzym bekannt, das bei hohen Temperaturen Protease- und bei niedrigen Chaperonfunktion besitzt. (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Spiess *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2011). Die Substratspezifität der HtrA-Proteasen variiert; während die proteolytische Aktivität von DegS aus *E. coli* eine hohe Selektivität aufweist (Walsh *et al.*, 2003), sind andere HtrA-Proteine, wie beispielsweise DegP aus *E. coli*, allgemein aktiv gegen ungefaltete Proteine (Kolmar *et al.*, 1996), die freiliegende und zugängliche hydrophoben Regionen aufweisen. Die HtrA-Proteasen zeichnen sich durch eine ähnliche Domänen-Architektur aus; sie besitzen neben einer Chymotrypsin ähnlichen Serinprotease Domäne, eine oder zwei C-terminale PDZ (postsynaptic density of 95 kDa, discs large, and zonula occludens) Domänen (Clausen *et al.*, 2002, Hansen und Hilgenfeld, 2013). Diese Domäne wurde nach den drei Proteinen PSD-95, DLG1, und ZO-1 benannt, in denen sie das erste Mal identifiziert wurde (Saras und Heldin, 1996). PDZ-Domänen sind globulär, verbreitete Struktur motive, die bei Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind (Pallen und Wren, 1997; Clausen *et al.*, 2011).

1.5.1 HtrA in *S. pneumoniae*

Im Jahre 1988 gabe es zum ersten Mal einen Hinweis auf die Anwesenheit der Serinprotease HtrA in *S. pneumoniae*, als es Gasc *et al.*, 1998 gelang die Genregion um *dnaA* zu klonieren und zu sequenzieren. Das Gen *htrA* aus *S. pneumoniae* befindet sich als erstes Gen in einem Operon mit *parB* (Merai, 2003), dessen Genprodukt bei der Chromosomenauftrennung während der Zellteilung beteiligt ist (Minnen *et al.*, 2011). Die Expression des Operons wird strikt durch den Responsregulator CiaR des Zwei-Komponenten System CiaRH reguliert (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011).

HtrA ist an der Zelloberfläche lokalisiert und über eine hydrophobe Region am N-terminus mit der Membran assoziiert (Serbert *et al.*, 2005). Laut Cassone *et al.*, 2012 handelt es sich hierbei um ein Signalpeptid. Vor kurzem konnte dagegen experimentell nachgewiesen werden, dass die Serinprotease

HtrA aus *S. pneumoniae* eine Transmembrandomäne besitzt (Olaya-Abril *et al.*, 2012). Des Weiteren beinhaltet die Serinprotease HtrA in *S. pneumoniae* eine Protease Domäne und eine C-terminale PDZ-Domäne (Abb. 1.7) und wird den Trypsin ähnlichen Serinproteasen zugeordnet (Clausen *et al.*, 2011). Die Protease Domäne beinhaltet die katalytische Triade: eine bestimmte Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum: in dem *S. pneumoniae* Enzym H122, D152 und S234 (Sebert *et al.*, 2005)

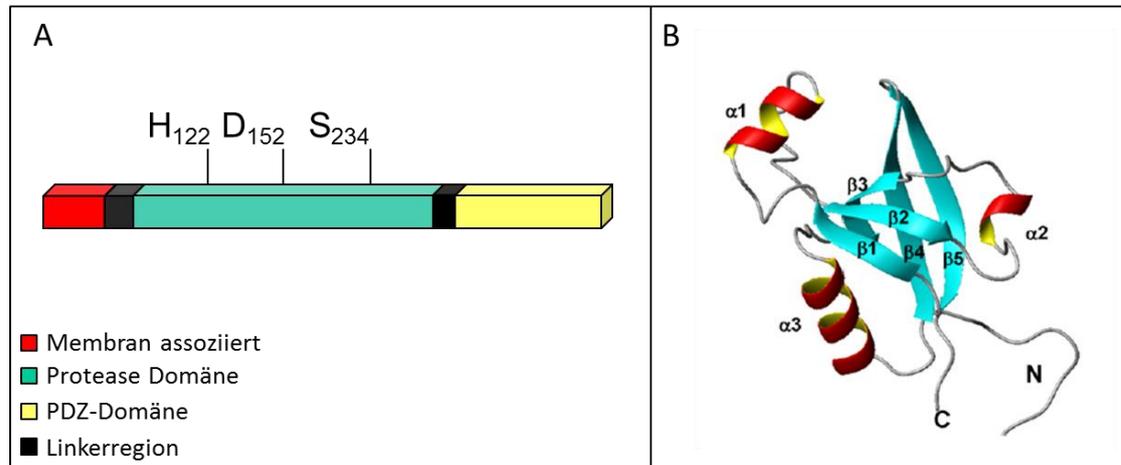


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und dreidimensionale Struktur der PDZ-Domäne der Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae*. **A:** Die Domänenstruktur des HtrAs aus *S. pneumoniae* wird durch Balken angedeutet. Am N-terminalen Ende befindet sich eine kurze hydrophobe Region, über die das Protein nach Sebert *et al.*, 2005 mit der Membran assoziiert ist. Die Protease-Domäne ist als grüner Balken dargestellt. Diese Domäne beinhaltet die katalytische Triade der AS Histidin, Asparaginsäure und Serin im aktiven Zentrum. Die genauen Positionen der Aminosäuren sind dem Text zu entnehmen. Das HtrA aus *S. pneumoniae* besitzt im Gegensatz zu dem homologen DegP aus *E. coli*, nur eine PDZ-Domäne. Diese befindet sich am C-Terminus des Proteins. **B:** Zu sehen ist die dreidimensionale Struktur der PDZ-Domäne der Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae*, die mittels NMR-Spektroskopie ermittelt wurde (aus Fan *et al.*, 2011). Die sekundären Strukturelemente sind farblich hervorgehoben: rot: α -Helix, hellblau: β -Faltblatt, grau: unstrukturierte Region (random coil).

Fan *et al.*, 2011 waren in der Lage die lösliche Struktur der PDZ-Domäne von HtrA mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären. Die PDZ-Domäne des HtrA aus *S. pneumoniae* besteht demnach aus drei α -Helices und fünf β -Faltblättern (Abb. 1.7 B). Sequenzvergleich der PDZ Domäne aus *S. pneumoniae* HtrA mit PDZ-Domänen aus *E. coli* und dem Menschen liefern zwar nur eine geringe Übereinstimmung von 20 %, dennoch sind sich die einzelnen PDZ-Domänen strukturell sehr ähnlich, was eine evolutionäre Konservierung innerhalb der HtrA-Protein Familie andeutet (Fan *et al.*, 2011). Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die PDZ-Domäne eine Peptid-bindende Furche besitzt, die in der Lage ist mehrere Peptide mit hydrophoben Aminosäureresten am C-Terminus zu erkennen (Fan *et al.*, 2011). Die Autoren vermuten, dass die PDZ-Domäne in der Lage ist die proteolytische Aktivität von HtrA zu regulieren.

Studien mit dem ebenfalls ellipsenförmigen, Gram-positiven Bakterium *S. pyogenes* zeigten, dass HtrA (Protease/Chaperon) zusammen mit der ATP-bindenden Untereinheit der SecA-Translokase an der Zelloberfläche eine einzelne, abgegrenzte, sekretorische Mikrodomäne ausbildet. Diese wird als „ExPortal“ bezeichnet (Rosch und Caparon, 2005). Anhand von Lokalisationsstudien mit dem Stamm *S. pneumoniae* D39 konnte die Bildung einer „Exportal“ Mikrodomäne in *S. pneumoniae* je-

doch nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte HtrA in diesem Fall während der Zellteilung eine Lokalisation am Zellseptum oder Äquator. SecA und SecY wiesen eine Verteilung auf, die vom Zellteilungsstadium abhängt (Tsui *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass HtrA für die Qualitätskontrolle von Proteinen zuständig ist, die durch die Sec-Translokase exportiert werden (Tsui *et al.*, 2011).

Zahlreiche Studien belegen einen von HtrA ausgehenden, wesentlichen Einfluss auf die Kompetenz in *S. pneumoniae*, wobei unterschiedliche Arbeitsgruppen teilweise widersprüchliche Ergebnisse erzielten (Ibrahim *et al.*, 2004a; Sebert *et al.*, 2005; Schäfer, 2007; Müller 2011). Während die Arbeitsgruppe um Ibrahim in einer *htrA*-Deletionsmutante eine Abnahme der Transformierbarkeit und somit eine Kompetenz stimulierende Wirkung von HtrA nachweisen konnte (Ibrahim *et al.*, 2004a); postulieren andere Arbeiten einen inhibitorischen Effekt der von HtrA auf die Kompetenz ausgeht (Sebert *et al.*, 2005; Müller, 2011). Sebert *et al.*, (2005) konnten beweisen, dass der Kompetenzdefekt, der durch das *ciaH306*-Allel und der damit einhergehenden konstitutiven Aktivierung von CiaH verursacht wird, durch die Inaktivierung von HtrA teilweise aufgehoben wird. Die Unterschiede in den erzielten Ergebnissen sind auf die Verwendung unterschiedlicher Deletionskonstrukten von *htrA* zurückzuführen und bei Ibrahim *et al.* 2004a möglicherweise durch polare Effekte zu erklären, die von dem Gen *parB* ausgehen.

HtrA wurde zusätzlich in mehreren Studien als wichtiger Virulenzfaktor in *S. pneumoniae* identifiziert (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a, b). So konnte anhand von Tierversuchen veranschaulicht werden, dass die Deletion von *htrA* im dem Stamm *S. pneumoniae* D39 mit einem kompletten Verlust der Virulenz einherging. Auch die Virulenz in dem Stamm *S. pneumoniae* TIGR4 wurde durch das Fehlen von HtrA beeinflusst und war deutlich reduziert (Ibrahim *et al.*, 2004b). In zusätzliche *in vitro*-Stressexperimenten wuchsen die *S. pneumoniae* D39 Stämme denen HtrA fehlte bei erhöhten Temperaturen (40°C) deutlich langsamer und konnten oxidativen Stress, der durch Gabe von Wasserstoffperoxid simuliert wurde, nicht tolerieren (Ibrahim *et al.*, 2004a). Des Weiteren gibt es Daten, die auf eine posttranskriptionelle Beteiligung von HtrA an der Bacteriocinproduktion in Pneumokokken schließen lassen (Dawid *et al.*, 2009). Dabei wurde postuliert, dass HtrA in *S. pneumoniae* des Serotyps 6A die Produktion des Zwei-Peptid Bacteriocins Pneumocin MN möglicherweise durch Abbau des BlpC Peptidpheromons auf der posttranskriptionellen Ebene negativ reguliert (Dawid *et al.*, 2009). Vor kurzem konnten Kochan und Dawid, (2013) nachweisen, dass HtrA die Pneumocinproduktion bei hohen Zelldichten bremst, indem die BlpC Akkumulation in der Umgebung verringert. Die ist jedoch laut den Autoren nicht auf einen direkten Abbau des Peptidpheromons durch HtrA zurückzuführen; vielmehr wird vermutet, dass HtrA die Prozessierung und Sekretion stört (Kochan und Dawid, 2013).

Es konnte auch bewiesen werden, dass die Serinprotease HtrA, die selbst ein Genprodukt des CiaR-Regulons ist, einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des CiaRH-Systems ausübt, da die Deletion von HtrA zu einer Aktivierung CiaR-abhängigen Genregulation führt (negative Feedback-Regulation, Müller, 2011).

Die Proteaseaktivität von HtrA aus *S. pneumoniae* konnte bereits von Sebert *et al.*, 2005 mittels β -Casein Zymogrammen nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus, durch den HtrA die Kompetenzentwicklung inhibiert, ist noch weitestgehend unklar. In einer vor kurzem erschienenen Studie konnte jedoch das pneumokokken CSP (c̄ompetence s̄timulating p̄ptide) als Substrat der Serinprotease HtrA identifiziert werden (Cassone *et al.*, 2012). Untersuchung zur kompetitiven Hemmung von HtrA offenbarten, dass das native Rinderalbumin (BSA) den Abbau von CSP durch HtrA nur schwach inhibiert, wohingegen die denaturierte Form von BSA sich als ein starker kompetitiver Inhibitor dieser Proteolyse herausstellte (Cassone *et al.*, 2012). Die Daten dieser Veröffentlichung bestärken weiterhin ein Model, in dem der Abbau des CSPs durch HtrA in der Anwesenheit von anderen ungefalteten Proteinen, die alternative Targets darstellen, reduziert ist. Durch das postulierte Model könnte der Mechanismus erklärt werden, durch den HtrA zur Qualitätskontrolle beiträgt und falsch gefaltete Proteine eliminiert (Cassone *et al.*, 2012). Obwohl HtrA aus *S. pneumoniae* bereits in mehreren Arbeiten umfassend untersucht wurde, ist dennoch recht wenig über die natürlichen Substrate dieser Serinprotease in *S. pneumoniae* bekannt.

1.6 Die Cefotaxim-resistenten Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und C606

Um die Resistenzentwicklung in *S. pneumoniae* besser nachvollziehen zu können, wurde diese in den 80er Jahren unter Laborbedingungen auf genetischer Basis untersucht (Laible und Hakenbeck, 1987). Dafür wurden ausgehend von dem penicillin-sensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6 sechs unabhängige resistente Mutantenfamilien C001 bis C006 durch Selektion mit sukzessiv gesteigerten Cefotaximkonzentrationen generiert. Die erstellten Laborstämme wurden mit dem Buchstaben C, der für das Selektionsantibiotikum Cefotaxim steht, und drei Zahlen benannt. Die erste Zahl bezeichnet dabei den Selektionsschritt und die letzte Zahl steht für die Mutanten-Familie (Laible und Hakenbeck, 1987).

Das für die Selektion verwendete Antibiotikum Cefotaxim zählt zu den Cephalosporinen der 3. Generation und besitzt eine selektive Wirkungsweise, da es aufgrund der geringen Bindungsaffinität nicht mit PBP2b interagieren und eine tolerante, d.h. nicht lytische, Antwort induzieren kann (Hakenbeck *et al.*, 1987). Die Zugabe von Cefotaxim führt, im Vergleich zu anderen Penicillinen, die eine rapide Lyse induzieren, zu einer langsameren Lyse der Bakterienzelle (Hakenbeck *et al.*, 1987). In *S. pneumoniae* besitzt das PBP2x von allen andern PBPs die höchste Affinität für Cefotaxim. Daher werden durch die Verwendung von Cefotaxim als Selektionsantibiotikum präferenziell Mutationen in PBP2x selektioniert (Laible und Hakenbeck, 1991; Sifaoui *et al.*, 1996; Negri *et al.*, 2002). Die Labormutanten der C-Familie wurden charakterisiert und auf genetische Veränderungen hin untersucht, wobei die Art und die Reihenfolge der Mutationen identifiziert wurden.

In den Cefotaxim-resistenten Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und C606, die im Fokus dieser Arbeit standen, wurden wie in allen C-Mutanten, mehrere Mutationen im PBP2x identifiziert (Laible und Hakenbeck, 1987; Abb. 1.8). Diese Punktmutationen vermitteln AS-Austausche innerhalb der Transpeptidase-Domäne von PBP2x und verringern die Affinität gegenüber β -Laktamen. Die Labor-

mutante *S. pneumoniae* C405 besitzt im Gen *pbp2x* zwei Punktmutationen, die zu den AS-Austauschen T526S und L403F in PBP2x führen. Weiterhin verfügt dieser Stamm über das *ciaH305*-Allel

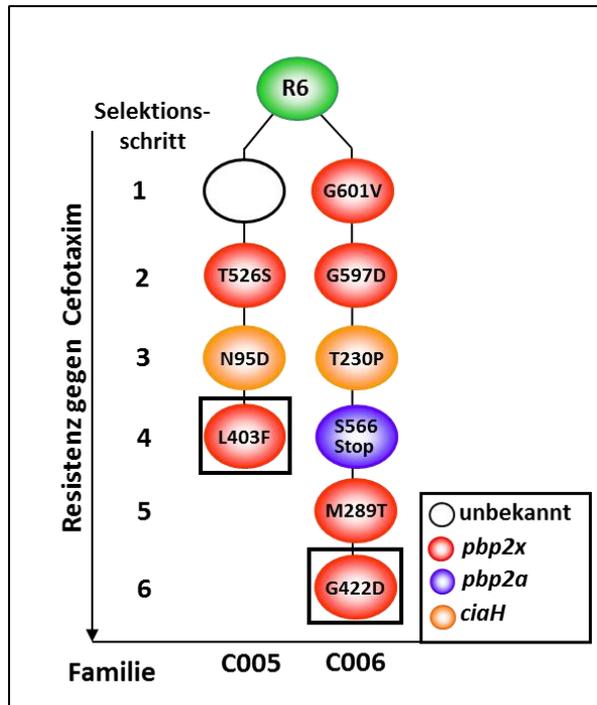


Abb. 1.8: Schematische Übersicht der spontan Cefotaxim-resistenten Labormutanten C405 und C606 (nach Laible und Hakenbeck; 1987; Laible und Hakenbeck, 1991). Dargestellt sind die zwei C-Mutantenfamilien, die ausgehend von dem sensiblen Stamm *S. pneumoniae* R6 (grün unterlegt) durch sukzessive Selektion mit dem Antibiotikum Cefotaxim hergestellt wurden. Die Resistenzhöhung ging dabei in nahezu allen Fällen mit einer Akkumulation an Punktmutationen in den Genen *pbp2x* und *ciaH* einher. Kreise symbolisieren einzelne Mutanten. Die Farben der Kreise zeigen die Resistenzdeterminanten an, die in dem jeweiligen Selektionsschritt erstmals identifiziert wurden. Die AS-Austausche, die durch die festgestellten Punktmutationen vermittelt werden, sind in den Kreisen aufgeführt. Die Stämme können auch nicht identifizierte Resistenzdeterminanten enthalten. Die Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und C606, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, sind durch Quadrate markiert.

mit der Punktmutation A283G, die den N95D-Austausch in CiaH vermittelt (Laible und Hakenbeck, 1987; Abb. 1.8). Die Labormutante *S. pneumoniae* C606 hat hingegen sogar vier Punktmutationen in *pbp2x*, welche wiederum die AS-Austausche G601V, G597D, M289T und G422D bewirken. Des Weiteren besitzt dieser Stamm das *ciaH306*-Allel mit der Punktmutation A688C, die zu dem T230P-Austausch in CiaH führt (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991). Im *pbp2a* Gen liegt ein 119 bp großer Genabschnitt dupliziert vor, was zu einer Leseraster-Verschiebung führt und in einem vorzeitigen Translations-Stopp nach S566 im PBP2a Protein resultiert (van der Linden, unveröffentlichte Daten, Rutschmann, 2011). Alle erwähnten AS-Austausche der PBP2x Proteine der Labormutanten C405 und C606 sind innerhalb der Transpeptidase-Domäne von PBP2x lokalisiert und verleihen gemeinsam nachweislich Resistenz gegen Cefotaxim (Maurer *et al.*, 2008). Zudem können beide PBP2x Proteine und auch das PBP2a aus C606 aufgrund ihrer Veränderungen nicht mehr mit dem fluoreszierenden PenicillinV-Derivat BocillinTMFL markiert werden.

Überraschenderweise wurde in den beiden Labormutanten C405 und C606 eine im Vergleich zum Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 deutlich reduzierte Menge des essentiellen Penicillin-Bindeproteins 2x nachgewiesen (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009), die mit dem Auftreten der Mutation L403F bzw. G422D korrelieren (Abb. 1.9). Vergleichende Expressionsanalysen des Gens *pbp2x* mittels quantitativer Real-Time-PCR zeigten keinen Unterschied in der *pbp2x*-Transkriptmenge aus *S. pneumoniae* C405 und C606 zu dem Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 (Peters, 2009). Somit kann eine verringerte mRNA-Menge als Ursache für die erniedrigte PBP2x-Menge ausgeschlossen werden. Es wird vermutet, dass die Veränderungen die Stabilität dieser PBP2x Proteine negativ beeinflussen (Maurer *et al.*,

2008), was sich wiederum negativ auf die Faltung der Proteine auswirken und einen Abbau begünstigen würde. Daher wurde die Lokalisation der AS-Austausche in PBP2x aus C405 und C606 sowohl in der dreidimensionalen Struktur des nativen (Pares *et al.*, 1996), als auch innerhalb der Acyl-Enzym Form (Mouz *et al.*, 1999) von PBP2x untersucht und mögliche strukturelle Folgen dieser Veränderungen innerhalb des Proteins theoretisch analysiert (Maurer *et al.*, 2008). In Abb. 1.9 ist die Lokalisation des T526S-Austauschs aus C405 innerhalb einer Loopstruktur zu sehen. Dieser Loop befindet sich zwischen den α -helikalen Strukturen $\alpha 9$ - $\beta 3$, in der Nähe des aktiven Serins an Position 337 von PBP2x (Maurer *et al.*, 2008). Der L403F-Austausch (Abb. 1.9) ist dagegen auf der α -Helix 5 lokalisiert und zeigt in die hydrophobe Nische, die die $\alpha 4$, $\alpha 2$ und den Loop $\alpha 2$ - $\beta 2a$ stabilisieren. Diese drei α -Helixstrukturen befinden sich wiederum in der direkten Nähe zum katalytischen Spalt. Demnach wird

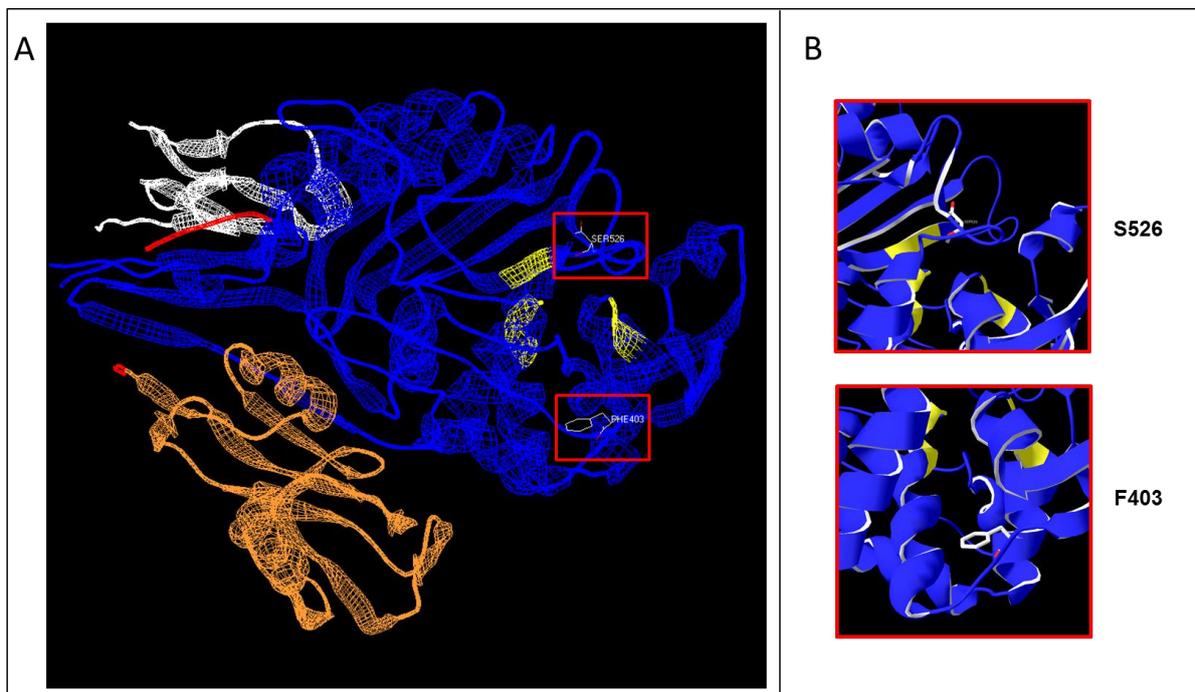


Abb. 1.9: Dreidimensionale Struktur des PBP2x der Labormutante *S. pneumoniae* C405. **A:** Wireframe-Modell des PBP2x aus C405. Die einzelnen Domänen des PBP2x farblich dargestellt. Weiß: N-terminale Domäne; blau: Transpeptidase-Domäne; orange: PASTA-Domänen; gelb: die Lagen der drei konservierten Boxen. Über eine Linkerregion sind die PASTA-Domänen mit der Transpeptidase-Domäne verbunden. Der Bereich der Linkerregion, der anhand der Kristallisation (Gordon *et al.*, 2000) aufgelöst werden konnte, ist in roter Farbe gezeigt. Die Positionen der zwei ausgetauschten Aminosäuren in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x sind durch rote Quadrate markiert. An der Position 403 wurde Leucin gegen Phenylalanin (F403) und an der Position 526 wurde Threonin gegen Serin ausgetauscht. **B:** Die Aminosäuren S526 (oben) und F403 (unten) sind in einer jeweils vergrößerten Detailansicht des Bereichs der Transpeptidase-Domäne zu sehen. Die Farben der einzelnen Domänen von PBP2x entsprechen denen aus Abb. 1.9 A. Die dreidimensionale Strukturen des PBP2x wurde mit dem Programm SwissPdbViewer, Version 4.1 und der Strukturdatei mit der Proteindatenbanknummer 1QMF (Gordon *et al.*, 2000) erstellt.

dieser Veränderung eine Schlüsselrolle bei der Anordnung der Helixstrukturen $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zugeordnet (Maurer *et al.*, 2008). Das Einführen des L403F-Austausches geht in C405 auch mit der entscheidenden Tatsache einher, dass PBP2x auf dem Fluorogramm nicht mehr detektiert werden kann (Laible und Hakenbeck, 1991). Dies spricht dafür, dass aufgrund dieser Veränderung die Bindung von β -

Laktamen verhindert wird. Für den L403F-Austausch zeigte sich bei der Labormutante C405 laut Krauß *et al.* 1996 zudem eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C, die die MHK bei 30 °C sinken lässt.

Im PBP2x aus C606 befindet sich der M289T-Austausch (Abb. 1.10) auf der β -Faltblattstruktur β 1 am N-Terminus der penicillin-bindenden Transpeptidase-Domäne. Der G422D-Austausch (Abb. 1.10) ist dagegen an der Oberfläche der Transpeptidase-Domäne, mit einem großen Abstand zum aktiven Zentrum lokalisiert, wobei die Seitenkette nach außen orientiert ist (Maurer *et al.*, 2012). Für beiden Mutationen wird daher ein geringerer Effekt auf das aktive Zentrum von PBP2x vermutet. Anhand von Bindungsstudien konnte für G422D kein Effekt auf die β -Laktambindung an das aktive Serin nachgewiesen werden (Maurer *et al.*, 2012). Allerdings ist im Fall des G422D-Austausches bekannt, dass dieser bei 37 °C eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim vermittelt; d.h. bei einer Inkubation der Bakterienzellen bei 37 °C wird eine wesentlich geringere MHK erreicht, als bei der Inkubation bei 30 °C (Krauß *et al.*, 1996; Zerfaß, 2010).

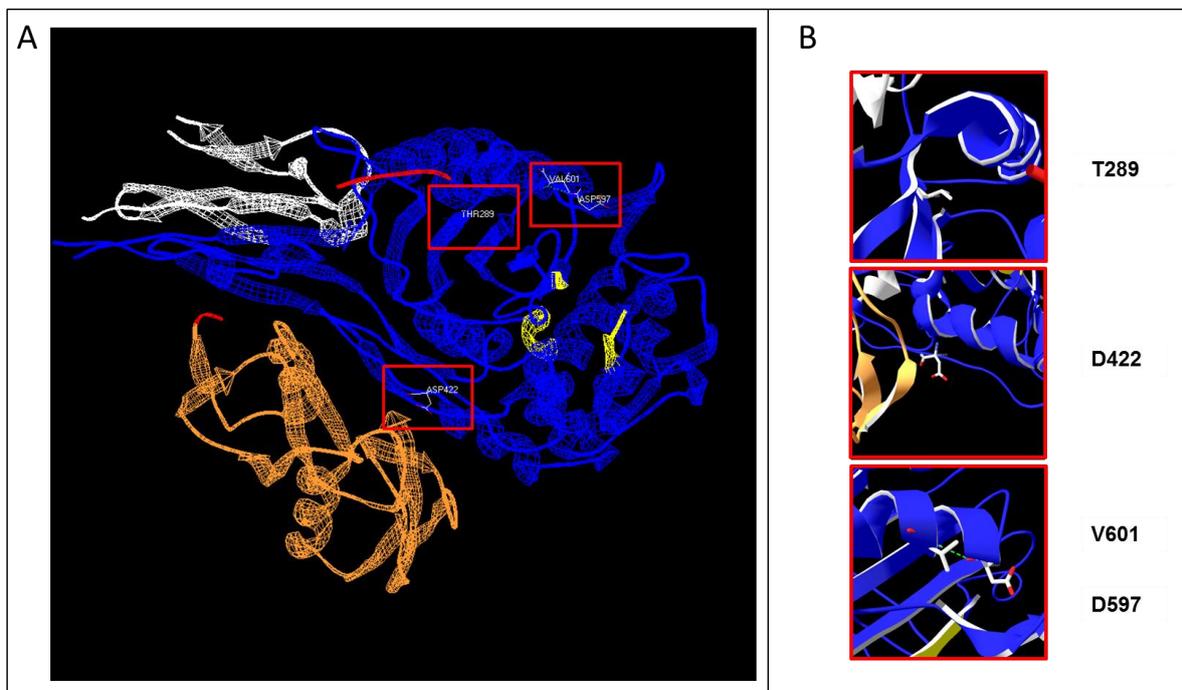


Abb. 1.10: Dreidimensionale Struktur des PBP2x der Labormutante *S. pneumoniae* C606. **A:** Wireframe-Modell des PBP2x aus C606. Die einzelnen Domänen des PBP2x farblich dargestellt. Weiß: N-terminale Domäne; blau: Transpeptidase-Domäne; orange: PASTA-Domänen; gelb: die Lagen der drei konservierten Boxen. Über eine Linkerregion sind die PASTA-Domänen mit der Transpeptidase-Domäne verbunden. Der Bereich der Linkerregion, der anhand der Kristallisation (Gordon *et al.*, 2000) aufgelöst werden konnte, ist in roter Farbe gezeigt. Die Positionen der vier ausgetauschten Aminosäuren in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x sind durch rote Quadrate markiert. An der Position 289 wurde Methionin gegen Threonin und an der Position 422 wurde Glycin gegen Aspartat ausgetauscht. Weiterhin wurden an der Position 597 Glycin gegen Aspartat (D597) und an der Position 601 Glycin gegen Valin ausgetauscht. **B:** Die Aminosäuren T289 (oben), D422 (Mitte), V601 und D597 (unten) sind in einer jeweils vergrößerten Detailansicht des Bereichs der Transpeptidase-Domäne zu sehen. Die Farben der einzelnen Domänen von PBP2x entsprechen denen aus Abb. 1.10 A. Die dreidimensionale Strukturen des PBP2x wurde mit dem Programm SwissPdbViewer, Version 4.1 und der Strukturdatei mit der Proteindatenbanknummer 1QMF (Gordon *et al.*, 2000) erstellt.

Die AS-Veränderungen G601V und G597D (Abb. 1.10) im PBP2x aus *S. pneumoniae* C606 befinden sich am N-terminalen Ende der α -Helixstruktur 11 und sind laut Analyse kritisch für die Konformation des aktiven Zentrums von PBP2x (Maurer *et al.*, 2008). Durch das Einbringen dieser Aminosäureaustausche werden längere Seitenketten in die C-terminale Region der α -Helix 11 gebracht; wobei durch den Austausch des Glycins an der Position 597 zu Asparaginsäure zusätzlich eine negative Ladung in die Nähe des aktiven Zentrums gelangt. Daher wird ein indirekter Effekt dieser AS-Austausche auf das aktive Zentrum durch allgemeine Topologieveränderung vermutet (Maurer *et al.*, 2008).

Durch das *ciaH305*-Allel aus C405 wird ein N95D-Austausch in CiaH vermittelt, der wiederum in der putativen extrazytoplasmatischen Sensordomäne des Proteins lokalisiert ist (Abb. 1.11; Müller *et al.*, 2011). Weiterhin ist bekannt, dass das *ciaH305*-Allel eine moderate, ca. 4fache Erhöhung der Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt (Müller *et al.*, 2011). Das identifizierte *ciaH306*-Allel in C606 bewirkt den Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin an der Position 230 von CiaH und führt zu einem transformationsdefizienten Phänotyp (Guenzi *et al.*, 1994; Sebert *et al.*, 2005). Die Veränderung in CiaH befindet sich in direkter Umgebung zu dem konservierten Histidins an Position 226 (Guenzi *et al.*, 1994) und ist in der Nähe der zweiten membran-durchspannenden Domäne lokalisiert (Abb. 1.11; Müller *et al.*, 2011).

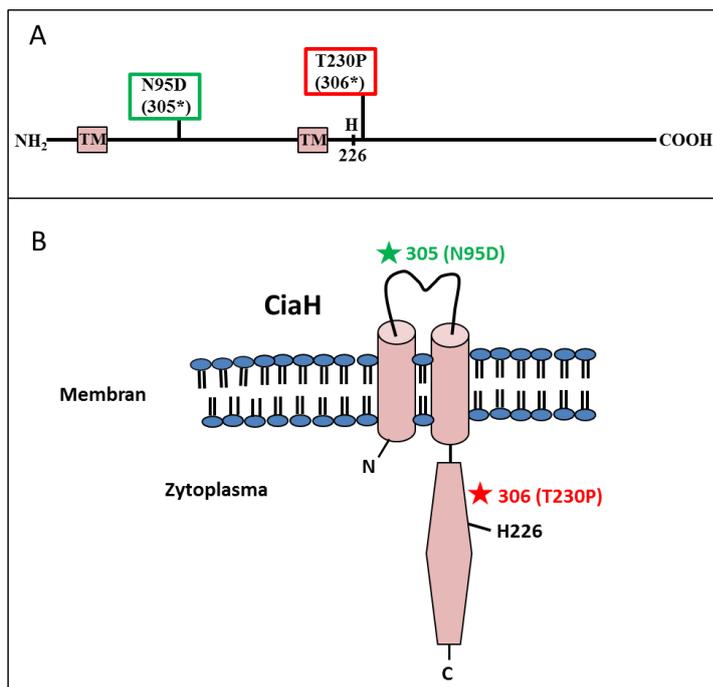


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Histidinkinase CiaH und die Lokalisation der Aminosäureaustausche, die durch die *ciaH*-Allele 305 und 306 vermittelt werden. A: Positionen der AS-Austausche, die durch die *ciaH*-Allele 305 und 306 vermittelt werden (nach Müller *et al.*, 2011). Die AS-Austausche sind in farbigen Kästchen gezeigt. Die korrespondierenden Allelnummern befinden sich in den Klammern. Die Position des Histidins 226 und die Lagen der Transmembranhelices (TM) sind angezeigt. B: Die Struktur des CiaH ist schematisch gezeigt. Die farbigen Sterne markieren die ungefähre Position der AS-Austausche in CiaH. Die Nummern der beiden *ciaH*-Allele, die zu dem jeweiligen Austausch führen, sind aufgeführt. Die erfolgten Aminosäureaustausche sind in Klammern geschrieben. Die Position des konservierten und für die Funktion wichtigen Histidins an der Position 226 ist markiert.

Durch den Aminosäureaustausch des *ciaH306*-Allel kommt es bekanntlicherweise zu einer starken Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation (Giammarinaro *et al.*, 1999, Mascher *et al.*, 2003 Halfmann *et al.*, 2007b), da die Phosphataseaktivität von CiaH positiv beeinflusst wird (Guenzi *et al.*, 1994) und dies wiederum zu einer gesteigerten Phosphorylierung von CiaR führt. Da das CiaR-Regulon bereits ohne aktivierende Mutationen effizient transkribiert wird (Halfmann *et al.*, 2011),

wird der Effekt, der von dem *ciaH306*-Allel ausgeht, auch als Hyperaktivierung von CiaR bezeichnet (Müller *et al.*, 2011). Das *ciaH306*-Allel bewirkt eine 11-13fache Erhöhung der Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp (Müller *et al.*, 2011).

Da die Laborstämme C405 und C606 jeweils eine Veränderung in CiaH aufweisen, die zur Erhöhung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität führen, war es wahrscheinlich, dass ein Gen, das zum CiaR-Regulon gehört, für die verringerte PBP2x-Menge in diesen Stämmen mit verantwortlich ist. Das Gen *htrA*, welches für die Serinprotease HtrA kodiert und durch das Zwei-Komponenten System CiaRH reguliert (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003) wird, kam für weitere Untersuchungen in Frage. *HtrA* zählt neben den kleinen regulatorischen csRNAs (*ccnA-E*) zu den am stärksten exprimierten Genen des CiaR-Regulons (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011). In Abb. 1.12 ist zum besseren Verständnis die Signaltransduktion des Zwei-Komponenten Systems aus *S. pneumoniae* und die Lokalisation der Proteine PBP2x und HtrA dargestellt.

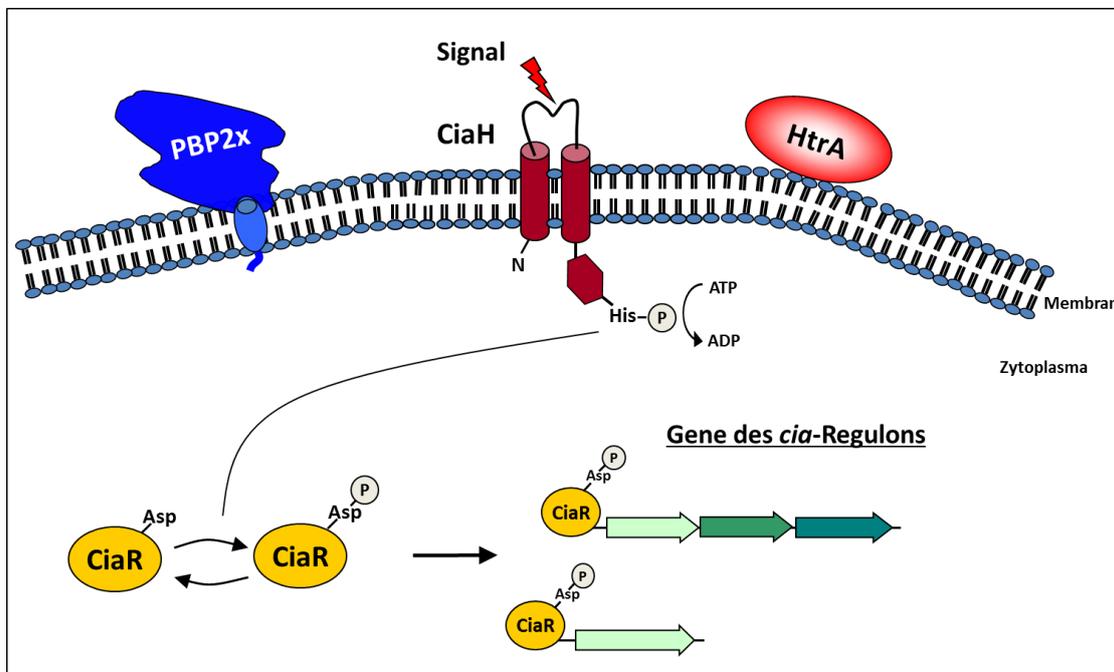


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des Zwei-Komponenten Systems aus *S. pneumoniae* und die Lokalisation der Proteine PBP2x und HtrA. Die membrangebundene Histidinkinase CiaH ist in dunkelroter Farbe und der zytoplasmatische Reponsregulator CiaR ist in gelb dargestellt. Die Histidinkinase nimmt über eine N-terminale, extrazelluläre Sensordomäne ein Signal (roter Blitz) wahr. Anschließend kommt es zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest innerhalb der zytoplasmatischen Kinasedomäne von CiaH. Daraufhin wird der Phosphatrest auf den ebenfalls konservierten Aspartatrest der Reponsregulators CiaR übertragen. Dieser nimmt dann seine aktive Form an, bindet an einer spezifischen Sequenz (CiaR-Bindestelle) im Promotorbereich der Gene des *cia*-Regulons und reguliert somit die Transkription dieser Gene. Durch eine hydrolytische Dephosphorylierungsreaktion wird der Reponsregulator deaktiviert. Die Transkription des Gens *htrA* wird von CiaR reguliert. Dieses Gen kodiert für die Serinprotease HtrA, die extrazellulär vorliegt und über eine hydrophobe Region an die Membran assoziiert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Serinprotease HtrA offensichtlich am Abbau von der veränderten PBP2x-Proteine in den Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und *S. pneumoniae* C606 beteiligt ist (Peters, 2009). Das Zellteilungsprotein PBP2x ist in *S. pneumoniae* essentiell (Kell *et al.*, 1993) und über einen hydrophoben Transmembranbereich in der Membran verankert.

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass sowohl die Serinprotease HtrA, als auch PBP2x extrazellulär vorliegen und mit der Zytoplasmamembran assoziiert bzw. in diese verankert sind. Aufgrund der erhöhten Promotoraktivität von P_{htrA} in den Stämmen C405 und C606 liegt HtrA in größeren Mengen vor. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die *htrA*-Transkriptmengen der Stämme R6, C405 und C606 ermittelt und verglichen. Tatsächlich konnte für C405 ein 3,5facher und im Fall von C606 sogar ein 12,5facher Anstieg der *htrA*-Transkriptmenge nachgewiesen werden (Peters, 2009). Western-Blotanalysen der Zelllysate dieser Stämme mit α -HtrA Antikörper zeigten des Weiteren eine erhöhte HtrA-Proteinmenge in C405 und C606, die mit der zuvor nachgewiesenen gesteigerten Expression von *htrA* korreliert (Peters, 2009). Um einen direkten Zusammenhang zwischen verringerter Menge des Penicillin-Bindeprotein 2x und HtrA herzustellen, wurde das Gen *htrA* in C405 und C606 durch das Einbringen einer Kanamycin-Resistenzkassette (Kap. 2.7.3.1) inaktiviert. Western-Blotanalysen zeigen, dass die Deletion des Gens *htrA* in den Labormutanten C405 und C606 den Effekt der verringerten PBP2x-Menge in diesen Mutanten aufhebt (Peters, 2009).

Die Mutationen in *pbp2x* aus C405 und C606 führen zu den bereits beschriebenen AS-Austauschen. Es wird vermutet, dass sie sich negativ auf die Faltung auswirken können, was wiederum zu nicht korrekt gefaltete PBP2x-Proteine führen würde (Maurer *et al.*, 2008). Die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* ist offensichtlich in der Lage den Anteil an falsch gefalteten und aggregierten Proteinen in der Zelle durch Abbau zu reduzieren. Im Fall der veränderten PBP2x Proteine aus C405 und C606 konnte die reduzierte Proteinmenge mit HtrA in Zusammenhang gebracht werden, was stark auf einen Abbau durch diese hindeutet.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Zentrum dieser Arbeit steht das essentielle PBP2x aus *S. pneumoniae*. Die verringerte Menge des essentiellen PBP2x der Laborstämme *S. pneumoniae* C405 und C606 konnte bereits auf die Serinprotease HtrA zurückgeführt werden (Peters, 2009). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte dieses Phänomen detailliert untersucht werden. Dabei sollte zunächst die PBP2x-Mengen im Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 und in der Labormutante C405 quantifiziert werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Protease- oder die Chaperonfunktion von HtrA Einfluß auf die PBP2x-Menge hat, und ob sich strukturelle Unterschiede der verschiedenen PBP2x-Varianten nachweisen lassen. Des Weiteren sollte das Gen *htrA* in Stämmen, die nur die jeweiligen PBP2x-Veränderungen beinhalten, mit Hilfe der Cheshire-Kassette, einer temporären, sich selbst deletierenden Erythromycin-Resistenzkassette (Weng *et al.*, 2009), deletiert werden. Anschließend sollten ektopische Komplementationsstämme erstellt werden, die die unterschiedlichen starken Promotoren P_{htrA} , P_{vegM} und $P_{16S rRNA}$ vor *htrA* beinhalten. Die Expression von *htrA* sollte dadurch stufenweise erhöht werden. Anhand von Western-Blotanalysen sollte überprüft werden, ob die erhöhten HtrA-Mengen in diesen Stämmen mit jeweils verringerten PBP2x-Mengen korreliert. Neben diesen *in vivo*-Studien sollte HtrA als Protein darge-

stellt werden, um die Wirkung von HtrA auf PBP2x *in vitro* untersuchen zu können. Bei erfolgreicher Überexpression von HtrA, sollte das Protein zum einen zur Antikörperherstellung gegen HtrA dienen. Im zweiten Teil sollte die Lokalisation von PBP2x aus dem Wildtyp R6 und aus der Labormutante C405 als GFP-Fusionsderivate unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden. Dafür sollen Konstrukte verwendet werden, die ausschließlich das jeweilige GFP-PBP2x Fusionsprotein über einen Zink-induzierbaren Promotor exprimieren. Da somit Versuche in Abwesenheit von Zn^{2+} durchgeführt werden können, sollte es möglich sein das jeweilige PBP2x in den Zellen zu depletieren und die physiologischen Auswirkungen zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

In Tab. 2.1 und Tab 2.2 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Streptococcus pneumoniae* Stämme aufgeführt. Dabei dienen die in Tab. 2.1 aufgelisteten Bakterienstämme teilweise als Ausgangsstämme für die Konstruktion der in Tab. 2.2 dargestellten Stämme.

Tab. 2.1: Verwendete Stämme von *S. pneumoniae*.

KL-Nummer	Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp	Referenz
			R36A-Derivat, kapselfrei, kompetent, β -Laktam ^S	Avery <i>et al.</i> , 1944; Ottolenghi und Hotchkiss, 1962
	amiA9	<i>rpsL</i> (K56T), Sm ^R	Str ^R	Sicard 1964; Salles 1992
	$\Delta htrA$	R6, <i>htrA::aphIII</i>	Kan ^R	Schäfer, 2007
	R6 _{pbp2xC405} -T6	R6, <i>pbp2x</i> (L403F, T526S)	β -Laktame ^R	Koch, 2006
	R6 _{pbp2xC405} -T5	R6, <i>pbp2x</i> (L403F)	β -Laktame ^R	Koch, 2006
	R6 _{pbp2xC606} -T6	R6, <i>pbp2x</i> (M289T, G422D, G597D, G601V)	β -Laktame ^R	Koch, 2006
	R6 _{pbp2xC606} -T1	R6, <i>pbp2x</i> (M289T, G597D, G601V)	β -Laktame ^R	Koch, 2006
	R6 <i>ciaH::janus</i>	R6, <i>ciaH::aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	Str ^S , Kan ^R	Schmitt, 2005
DKL03	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -T1	R6, $\Delta bgaA::tetM$ -P _{czcD} - <i>gfp-pbp2x</i>	Tet ^R	Stahlmann, 2011
DKL031	R6 <i>gfp-pbp2x</i> Δ <i>pbp2x</i> -TX1	DKL03, $\Delta pbp2x::aad9$	Tet ^R , Spc ^R	Stahlmann, 2011
DKL12	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -OP	R6, $\Delta bgaA::tetM$ -P _{czcD} - <i>gfp-pbp2x</i> OP (Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750) ^a	Tet ^R	Schweizer, 2011
DKL123	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -OP $\Delta htrA$	DKL12, <i>htrA::aphIII</i>	Tet ^R , Kan ^R	Denapaitte, persönliche Mitteilung
DKL15	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -NP	R6, $\Delta bgaA::tetM$ -P _{czcD} - <i>gfp-pbp2x</i> NP (Deletion in PBP2x von AS T56 bis D616) ^a	Tet ^R	Breckner, 2012
DKL151	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -NP $\Delta htrA$	DKL15, <i>htrA::aphIII</i>	Tet ^R , Kan ^R	Denapaitte, persönliche Mitteilung

KL-Nummer	Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp	Referenz
DKL17	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -OT	R6, $\Delta bgaA::tetM$ -P _{czcD} ⁻ <i>gfp-pbp2x</i> OT (Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616) ^a	Tet ^R	Breckner, 2012
DKL171	R6 <i>gfp-pbp2x</i> -OT $\Delta htrA$	DKL17, <i>htrA::aphIII</i>	Tet ^R , Kan ^R	Denapaite, persönliche Mitteilung
	C405	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> (L403F, T526S), <i>ciaH</i> (N95D)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
	C606	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, <i>pbp2x</i> (M289T, G422D, G597D, G601V), <i>ciaH</i> (T230P), <i>pbp2a</i> (S566Stopp)	nicht kompetent, β -Laktame ^R	Laible und Hakenbeck, 1987
KPKL5	C405 $\Delta htrA$	C405, <i>htrA::aphIII</i>	β -Laktame ^R , Kan ^R	Peters, 2009
KPKL6	C606 $\Delta htrA$	C606, <i>htrA::aphIII</i>	β -Laktame ^R , Kan ^R	Peters, 2009
KPKL2011	R6 <i>pbp2x</i> C405 <i>ciaH</i> 305	R6 _{<i>pbp2x</i>C405} -T6, <i>ciaH</i> (N95D)	Kan ^S , Str ^R	Heß, 2012
	R6PP2	R6, <i>bgaA::tetM-lacZ</i>	Tet ^R	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL43	R6 PP2 <i>htrA</i>	R6, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	Tet ^R	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL45	R6 PP2 <i>vegM</i>	R6, <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	Tet ^R	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL162	R6 <i>ciaH</i> 202 Strep ^R	R6, <i>ciaH</i> (Q236K, A413T)	Kan ^S , Str ^R	Müller, 2011
RKL191	R6 <i>ciaH</i> 202 $\Delta ciaR$ Strep ^R	RKL162, <i>ciaR</i> -Minigen (Δ AS16-204)	Str ^R	Müller, 2011

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

^a Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die unter der Genbanknummer NC_003098.1 abgelegten Sequenz von PBP2x.

Tab. 2.2: Für diese Arbeit konstruierte Stämme von *S. pneumoniae*.

KL-Nummer	Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp
KPKL1	R6 $\Delta htrA$	R6, $\Delta htrA::lox72$	
KPKL11	R6 $\Delta htrA$ pKP01	KPKL1, <i>bgaA</i> $::tmp$ -P _{<i>htrA</i>} - <i>htrA</i>	Tmp ^R
KPKL12	R6 $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i>	KPKL1, <i>bgaA</i> $::tmp$ -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i>	Tmp ^R
KPKL131	R6 $\Delta htrA$ P _{<i>16S rRNA</i>} - <i>htrA</i> -T10	KPKL1, <i>bgaA</i> $::tmp$ -P _{<i>16S rRNA</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (G235S)	Tmp ^R

KL- Nummer	Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp
KPKL132	R6 $\Delta htrA$ P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> -T16	KPKL1, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> , Inter- gener Bereich zw. P _{16S rRNA} und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 5. bp	Tmp ^R
KPKL133	R6 $\Delta htrA$ P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> -T47	KPKL1, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> , Inter- gener Bereich zw. P _{16S rRNA} und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 13. bp (ein G), Intergener Bereich zw. spr0566' und P _{16S rRNA} : stromabwärts des Stoppcodons von spr0566' fehlt das 11. bp	Tmp ^R
KPKL134	R6 $\Delta htrA$ P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> -T51	KPKL1, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> , Inter- gener Bereich zw. P _{16S rRNA} und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 13. bp (ein G), Intergener Bereich zw. spr0566' und P _{16S rRNA} : stromabwärts des Stoppcodons von spr0566' fehlt das 11. bp	Tmp ^R
KPKL135	R6 $\Delta htrA$ P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> -T60	KPKL1, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{16S rRNA} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (N121D)	Tmp ^R
KPKL14	R6 $\Delta htrA$ <i>htrA</i> _{S234A}	KPKL1, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>htrA</i>} - <i>htrA</i> _{S234A}	Tmp ^R
KPKL2	R6 PP216S <i>rRNA</i>	R6, <i>bgaA</i> :: <i>tetM</i> -P _{16S rRNA} - <i>lacZ</i>	Tet ^R
KPKL3	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$	R6 _{pbp2x_{C405}} -T6, $\Delta htrA$:: <i>lox72</i>	β -Laktame ^R
KPKL31	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ pKP01	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>htrA</i>} - <i>htrA</i>	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL321	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T2	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (F23L, S24V, G25E, A26P, L27W, G28V, S29V, S31Q, Stop nach AS 31), Intergener Bereich zw. ' <i>veg5</i> und P _{<i>vegM</i>} : 16 bp strom- abwärts des Stoppcodons von ' <i>veg5</i> A→G	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL322	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T3	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (N283K, G284R, V286S, T287D, R288A, P289S, A290S, L291T, I293N, Q294P, M295D, V296G, Stopp nach AS 296)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL323	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T4	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (E102G)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL324	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T7	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (L298S)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL325	R6 2x _{C405} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> - T10	KPKL3, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (T6H, Y8T, K10N, W11G, Q13N, L14Y, Stopp nach AS 14)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL4	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$	R6 _{pbp2x_{C606}} -T6, $\Delta htrA$:: <i>lox72</i>	β -Laktame ^R
KPKL41	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ pKP01 (pSW1-P _{<i>htrA</i>} - <i>htrA</i>)	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>htrA</i>} - <i>htrA</i>	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL421	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} <i>htrA</i> -T1	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (V196A)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL422	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T5	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (V208A)	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL423	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> -T6	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{<i>vegM</i>} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (L188S)	β -Laktame ^R , Tmp ^R

KL-Nummer	Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp
KPKL424	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ P _{vegM} - <i>htrA</i> -T9	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{vegM} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (Q37R), -35 Region von P _{vegM} : 2. bp (T) fehlt	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL425	R6 2x _{C606} $\Delta htrA$ P _{vegM} - <i>htrA</i> -T16	KPKL4, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{vegM} - <i>htrA</i> , <i>htrA</i> (N283T, G284E, Stopp nach AS 285), Intergener Bereich zw. P _{veg} und spr0566: 64 bp vor P _{vegM} A→G	β -Laktame ^R , Tmp ^R
KPKL51	C405 $\Delta htrA$ <i>htrA</i> _{S234A}	KPKL5, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{htrA} - <i>htrA</i> _{S234A}	β -Laktame ^R , Kan ^R , Tmp ^R
KPKL61	C606 $\Delta htrA$ <i>htrA</i> _{S234A}	KPKL6, <i>bgaA</i> :: <i>tmp</i> -P _{htrA} - <i>htrA</i> _{S234A}	β -Laktame ^R , Kan ^R , Tmp ^R
KPKL7	C405 <i>gfp-pbp2x</i> C405	C405, $\Delta bgaA$:: <i>tetM</i> -P _{czcD} - <i>gfp-pbp2x</i> C405	β -Laktame ^R , Tet ^R
KPKL71	C405 <i>gfp-pbp2x</i> C405 $\Delta pbp2x$	KPKL7, $\Delta pbp2x$:: <i>aad9</i>	β -Laktame ^R , Tet ^R , Spc ^R
KPKL711	C405 <i>gfp-pbp2x</i> C405 $\Delta pbp2x$ $\Delta htrA$	KPKL71, <i>htrA</i> :: <i>aphIII</i>	β -Laktame ^R , Tet ^R , Spc ^R , Kan ^R
KPKL8	R6 2x _{C405} <i>gfp-pbp2x</i> C405	R6 _{pbp2xC606} -T6, $\Delta bgaA$:: <i>tetM</i> -P _{czcD} - <i>gfp-pbp2x</i> C405	β -Laktame ^R , Tet ^R
KPKL81	R6 2x _{C405} <i>gfp-pbp2x</i> C405 $\Delta pbp2x$	KPKL8, $\Delta pbp2x$:: <i>aad9</i>	β -Laktame ^R , Tet ^R , Spc ^R
KPKL811	R6 2x _{C405} <i>gfp-pbp2x</i> C405 $\Delta pbp2x$ $\Delta htrA$	KPKL81, <i>htrA</i> :: <i>aphIII</i>	β -Laktame ^R , Tet ^R , Spc ^R , Kan ^R
KPKL09	R6 <i>gfp-pbp2x</i> $\Delta pbp2x$ -TX1 $\Delta htrA$	DKL031, <i>htrA</i> :: <i>aphIII</i>	Tet ^R , Spc ^R , Kan ^R
KPKL10	R6 2x _{C606} <i>rpsL</i> (K56T)	R6 _{pbp2xC606} -T6, <i>rpsL</i> (K56T)	β -Laktame ^R , Str ^R
KPKL101	R6 2x _{C606} <i>ciaH</i> :: <i>janus</i>	KPKL10, <i>ciaH</i> :: <i>aphIII-rpsL</i> ⁺ , <i>rpsL</i> (K56T)	β -Laktame ^R , Str ^S , Kan ^R
KPKL1011	R6 2x _{C606} <i>ciaH</i> 306-T4	KPKL101, <i>ciaH</i> (T230P), <i>ciaH</i> (E255K), <i>rpsL</i> (K56T)	β -Laktame ^R , Str ^R , Kan ^S
KPKL1012	R6 2x _{C606} <i>ciaH</i> 306-T5	KPKL101, <i>ciaH</i> (T230P), <i>ciaH</i> (E255K), <i>rpsL</i> (K56T)	β -Laktame ^R , Str ^R , Kan ^S
KPKL1013	R6 2x _{C606} <i>ciaH</i> 306-T7	KPKL101, <i>ciaH</i> (T230P), <i>ciaR</i> (G36T), <i>rpsL</i> (K56T)	β -Laktame ^R , Str ^R , Kan ^S

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

In Tab. 2.3 sind alle verwendeten und erstellten *Escherichia coli* Stämme aufgelistet, die für Klonierungs-, Transformations- und Überexpressionsexperimente verwendet wurden.

Tab. 2.3: Verwendete und erstellte Stämme von *E. coli*.

Bakterienstamm	Genotyp	relevanter Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , $\Delta(lac)U169$, ($\Phi 80$ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i>	keine Resistenz	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i> λ (DE3) [pLysS Cm ^R]	Cm ^R	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA46</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F' <i>[traD36, proAB+, lacIq,</i> <i>lacZ</i> Δ M15]		Sambrook <i>et al.</i> , 1989

Abk.: R (resistent), Cm (Chloramphenicol)

2.2 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide, sind in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Verwendete und erstellte Plasmide.

Plasmid / Vektor	Merkmale	Selektionsbedingungen	Referenz
pGEM [®] -T Easy	<i>lacZa'</i> , <i>bla</i>	¹ Amp: 100 μ g/ml	Promega
pKP1	pGEM-T-Easy Derivat, <i>htrA</i> mit nativem Promotor	¹ Amp: 100 μ g/ml	diese Arbeit
pSW1	pPB3-Derivat, in welches eine MCS eingebracht wurde	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tmp: 15 μ g/ml	Schnorpfeil, 2010
pKP01	pSW1 Derivat, <i>htrA</i> mit nativem Promotor	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tmp: 15 μ g/ml	diese Arbeit
pPP2	<i>lacZ</i> -Reportergen, GenBank Nr.: EF061139	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tet: 3 μ g/ml	Halfmann <i>et al.</i> , 2007a
pKP02	pPP2-Derivat, <i>P_{16S rRNA-lacZ}</i> Fusion, Replikon: ColE1	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tet: 3 μ g/ml	diese Arbeit
pJWV25	pPP2-Derivat, <i>P_{czcD}</i> (Zn ²⁺ -induzierbar), <i>gfp</i> ⁺ mit <i>SpeI</i> - und <i>NotI</i> -Schnittstelle am 3'-Ende	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tet: 2,5 μ g/ml	Eberhardt <i>et al.</i> , 2009
pFP12	pJWV25-Derivat, enthält <i>P_{czcD-gfp-pbp2x_{C405}}</i> -Fusion	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Tet: 2,5 μ g/ml	diese Arbeit
p2xKO	pUC19-Derivat, enthält <i>Spc</i> -Resistenzgen <i>aad9</i> mit flankierenden Bereichen von <i>pbp2x</i> zur Deletion von <i>pbp2x</i> in <i>S. pneumoniae</i> R6	¹ Amp: 100 μ g/ml ² Spc: 20 μ g/ml	Stahlmann, 2011
pGEX-6P-1	Klonierungsvektor zur Überexpression von GST-Tag Proteinen	¹ Amp: 100 μ g/ml	Amersham Biosciences
pKP03	pGEX-6P-1 Derivat zur Überexpression von GST-HtrA _{S234A} (Protease Aktivität inaktiviert), HtrA ab AS 1 bis 393	¹ Amp: 100 μ g/ml	diese Arbeit

Plasmid / Vektor	Merkmale	Selektionsbedingungen	Referenz
pQE-80L-Kan	Vektor zur Überexpression von N-terminalen His ₆ -Fusionsproteinen	¹ Kan: 25 µg/ml	Qiagen
pKP04	pQE-80L-Kan Derivat, zur Überexpression von His ₆ -HtrA _{S234A} (Protease-Aktivität inaktiviert), HtrA ab AS 1 bis 393	¹ Kan: 25 µg/ml	diese Arbeit
pKP041	pQE-80L-Kan Derivat, zur Überexpression von His ₆ -HtrA _{S234A} OTM (Protease-Aktivität inaktiviert), AS 2 bis 30 deletiert	¹ Kan: 25 µg/ml	diese Arbeit
pKP042	pQE-80L-Kan Derivat, zur Überexpression von His ₆ -HtrAoTM, AS 2 bis 30 deletiert	¹ Kan: 25 µg/ml	diese Arbeit
pGEX-6P-1-tet	pGEX-6P-1 Derivat, Amp ^R durch Tet ^R ersetzt	¹ Tet: 20 µg/ml	Maurer <i>et al.</i> , 2008
pGEX-6P-1-tet wt 2x	pGEX-6P-1-tet Derivat, zur Überexpression von GST-PBP2 _{x_{wt}} ab AS 49 bis 750	¹ Tet: 20 µg/ml	Koch, 2006
pGEX-6P-1-tet C405 2x	pGEX-6P-1-tet Derivat, zur Überexpression von GST-PBP2 _{x_{C405}} ab AS 49 bis 750	¹ Tet: 20 µg/ml	Koch, 2006
pGEX-6P-1-tet C606 2x	pGEX-6P-1-tet Derivat, zur Überexpression von GST-PBP2 _{x_{C606}} ab AS 49 bis 750	¹ Tet: 20 µg/ml	Koch, 2006

Abk.: R (resistent), Amp (Ampicillin), Kan (Kanamycin), Spc (Spectinomycin), Tet (Tetracyclin), Tmp (Trimethoprim), ¹ in *E. coli*, ² in *S. pneumoniae*.

2.3 Oligonukleotide

Die folgenden Tab. 2.5-2.19 zeigen alle zur Amplifikation von Genen, Herstellung, Überprüfung und Sequenzierung von Konstrukten, verwendeten Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Aus den lyophilisiert gelieferten Oligonukleotiden wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl in Tris-EDTA (TE-Puffer) hergestellt und bei -20 °C gelagert. Gebrauchslösungen hatten eine Konzentration von 10 pmol/µl; wurden in H₂O hergestellt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.5: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *pbp2x*.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
pbp2x_J_F	301823-301842	20→	GGAATTGGTGTCCCGTAAGC
pbp2x_J_R	304622-304602	21←	CATCTGCTGGCCTGTAATTG
2x2296mut-for	303418-303452	35→	GACTTTTTTACAAGGTTTGCACACTCAAG TAACG
2x2461mut-for	303583-303612	30→	TATTGTCAGTATTGCGCAAAGCTCATTGG
2x2484mut_rev	303606-303575	32←	GAGCTTTGCGCAATACTGACAATATTATC CGC
2x_seq01_for	303123-303146	24→	ACATGACCGCGACCTTGGTCAGTG
120-R6_rev	303337-303315	23←	AAAGACTTCTCCTCCTGGAAAGG
pbp2x-seq03_rev	302836-302815	25←	TTGTCGGTTTGGGTAACACTACGATTG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaRH*.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
ciaH_for	707853-707882	30→	TCGGTTGTCTGAAGTCTATGTTTCAAAGTC
ciaH_rev	709364-709340	25←	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
ciaH-seq_for	708500-708528	29→	AATTGATTGTGGTCGTGATGGCTAGTTTC
CiaHup_ff	707087-707116	30→	CGGTATGGGAATCAAGGAAATT- GCAGCACG
CiaHdown_rr	710004-709972	33←	TCCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATACG GTCC
CiaHup_f	707144-707173	30→	TGCAGTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATACG G
CiaHdown_r	709948-709919	30←	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAG C

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

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

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_kompl- NheI	2037640-2037619	31←	CTAGCTAGCCTACACTAACACATCTTTTC TC
htrA_Ala_r	2037121-2037087	35←	GCTATTAACCCAGGTAACCCGGCGGCCCA CTGAT
htrA_Ala_f	2037087-2037121	35→	ATCAGTGGGCCCGCGGCGTTACCTGGGTT AATAGC
htrA_pcr3_r	2038528-2038502	27←	AATCCACAATGTTACCAAACCTTTATCC
htrA_pcr3_f	2037570-2037604	35→	GGGGCCATGGAATCTTAATTGACATCTAT GTAAAG
htrA_pcr1_f	2035293-2035321	29→	CGTCCCAAATCCAAATAAATCCATTACTC
htrA_pcr1_r	2036421-2036387	35←	GGGGACGCGTTTTTCATATTTGCCTCCATA TGTTG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).
Angefügte *NheI*, *MluI*, *NcoI* Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Deletion von *htrA* mittels Kanamycin-Resistenzkassette und Sequenzierung der Transformanten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_ko_6	2035283-2035304	22→	GAACAATAACCGTCCCAAATCC
htrA_ko_1	2035363-2035385	23→	CACGGAAGAATTTTGACAACCTC
spo0J1	2038577-2038556	22←	GAGATATTTTACCATAGATAGC
N17	2038400-2038378	23←	TTTCAGGCTGTTGATAATTCTAC
KO-Kan_P2	-	34←	CCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCA GCCATAG
KO-Kan_P33_ for	-	29→	GGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGATCTTGG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Deletion von *htrA* mittels Cheshire-Kassette und Sequenzierung der Transformanten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_pcr1_f	2035293-2035321	29→	CGTCCCAAATCCAAATAAATCCATTCTC
htrA_pcr1_r	2036421-2036387	35←	GGGGACGCGTTTTTCATATTTGCTCCATAT GTTTG
htrA_pcr3_f	2037570-2037604	35→	GGGGCCATGGAATCTTAATTACATCTATGT AAAG
htrA_pcr3_r	2038528-2038502	27←	AATCCACAATGTTACCAAACCTTTATCC
Che_Mlu	-	30→	GGGGACGCGTTGGCTTACCGTTCTATAGC
Cre_Nco	-	30←	GGGGCCATGGTCGATACCGTTCTATAATG
htrA_kontrolle_f	2035238-2035265	28→	GACCTTTACAAATAAAATGGTAACTGTG
htrA_kontrolle_r	2038566-2038540	27←	CCATAGATAGCAAGAATTTTCCACAAG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098). Angefügte **MluI** und **NcoI** Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pGEM-T-Easy.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
pUK-M13 forward24	-	24→	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
pUK-M13 reverse22	-	22←	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.11: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pSW1 und zur Kontrolle der Integration in das Genom von *S. pneumoniae*.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
pBP4_f	-	30→	CCGATTCCGGGTTTCATATGAAAATTCCTCC
pBP5_r	-	30←	CTACGCTGATGAACCTGAATCAGTCCCTCA
IntFragA_up	577651-577680	30→	TCATGACCGCGTTGACTATCTCAATGACGG
IntFragB_down	580283-580254	30←	TAGCCCTCTCAATCCTAGCCATTATTCTCG
IntFragA_up_f		31→	CAATGACGGAGATCATTTCAGAAAATCGTT GG
IntFragB_down_r	580281-580246	36←	GCCCTCTCAATCTCAGCCATTATTCTCGTCT TTTTC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.12: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierung in pPP2 und zur Kontrolle der Integration in das Genom von *S. pneumoniae*.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
EII_fwd_Kontr	570733-570758	26→	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_Kontr	-	26←	TATCTTTCACGGGCATATAACGATGC
MCS_fwd_Kont	-	22→	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274-lac	-	20	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG
bgaA_rev_Kont	579108-579083	26←	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
16S_ppf	14736-14754	28→	ACATGCATGCAGTCATGCAAAAAAAAAATG
16S_ppr	14823-14793	30←	GCGGGATCCGTTGCTATTTTCAACTCTTAC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098). Angefügte *SphI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.13: Oligonukleotide zur Herstellung von *htrA*-Komplementationsderivaten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_kompl-NheI	2037640-2037619	31←	CTAGCTAGCCTACACTAACACATCTTTTCTC
htrA_normal_fl	2036242-2036265	33→	CGCGGATCCTCTCTATTTTTTTCACATCTTATTC
htrA_vegM_fl	1243272-1243284	31→	CGCGGATCCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC
16sRNA_ppf_BamHI	14736-14753	27→	CGCGGATCCAGTCATGCAAAAAAAAAATG
htrA_16sRNA-P-1	2036383-2036406	49→	AATAGTAAGAGTTGAAAATAGCAACAATTC AAACATATGGAGGCAAATA
htrA-16sRNA-P_2	14823-14799	49←	TATTTGCCTCCATATGTTTGAATTGTTGCTA TTTTCAACTCTTACTATT

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098). Angefügte *NheI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.14: Oligonukleotide zur Herstellung von HtrA_{S234A}-Derivaten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_kompl-NheI	2037640 - 2037619	31←	CTAGCTAGCCTACACTAACACATCTTTTCTC
htrA_Ala_r	2037121 - 2037087	35←	GCTATTAACCCAGGTAACCCGGCGGCCAC TGAT
htrA_Ala_f	2037087 - 2037121	35→	ATCAGTGGGCCCGCCGGCGTTACCTGGGTTA ATAGC
htrA_normal_fl	2036242-2036265	33→	CGCGGATCCTCTCTATTTTTTTCACATCTTATTC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098). Angefügte *NheI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.15: Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung von *S. pneumoniae* R6 2x_{C606} *ciaHC306* Transformanten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
rpsL_f	247459 - 247488	30→	AGTGTACAGGGACGTGCTGACAAATGTTGC
rpsL_r	248050 - 248021	30←	ATTGTATAGCGGATCTGGCAATACGTCACG
ciaH_for	707853 - 707882	30→	TCGGTTGTGCGAAGTCTATGTTTCAAAGTC
ciaH_rev	709364 - 709340	25←	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
ciaH-seq_for	708500 - 708528	29→	AATTGATTGTTGTCGTGATGGCTAGTTTC
CiaHup_ff	707087 - 707116	30→	CGGTATGGGAATCAAGGAAATTGCAGCACG

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
CiaHdown_rr	710004 - 709972	33←	TCCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATA CGGTCC
CiaHup_f	707144 – 707173	30→	TGCAGTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATA CGG
CiaHdown_r	709948 - 709919	30←	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACC AGC
KO-Kan_P2	-	34←	CCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCA GCCATAG
KO-Kan_ P33_for	-	29→	GGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGATCTT GG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.16: Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung von GFP-PBP2x Fusions Konstrukten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
pJWV25-screen F	-	20→	GACAACCATTACCTGTGCGAC
pJWV25-screen R	578111 - 578092	20←	TTGGTGCAAGGAAGGTCATC
PczcD_seq_for	1645670 - 1645646	25→	GCTGATACGGCGGTCAATGTTAGTC
gfp_seq_for1	1645207 - 1645188	20→	CGCAACCAGTCAATGATGAG
gfp_seq_for2	-	20→	AAGAGTGCCATGCCCGAAGG
bgaA-check-F	570613 -570633	21→	CCACTCGCAACAATCACTTGG
bgaA-check-R	578901 - 578881	21←	GGTTGAGAACTATTTTGTTCC
2x_seq01_for	-	24→	ACATGACCGCGACCTTGGTCAGTG
2x_2059_rev	304319 - 304302	18←	GGACTTGCTGGTTCGGGG
2x1453_for	302575 - 302600	26→	GTCAGCAACGGGTAAGCTTCTTTACG
MCS_fwd_Kontr	-	22→	GCGACATTCACGATTACTTGGC
pbp2x_gfp_r	304515 - 304477	56←	ATAAGAATGCGGCCGCTTATTAGTCTC CTAAAGTTAATGTAATTTTTTTAATGTC C
pbp2x_gfp_f	302264 – 302292	39←	GCG ACTAGT AAGTGGACAAAAAGAG TAATCCGTTATGC
pbp2x_for_kontr	304131 - 304157	27←	CTAAGGCTTTGGAGCAAGTAAGTCAAC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

NotI und **SpeI** Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.17: Oligonukleotide für die Herstellung und Sequenzierung von pbp2x-Deletionskonstrukten.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
KO2xR6_kont-f	301079 - 301105	27→	AGCAGGACATAGCGAGTATTTATTAAG
KO2xR6_kontr_r	305582 - 305557	26←	CAGCCTAAAGTTAGCTTTCTAGTTTG
mraY_1	304761 – 304783	23→	TTGTTTCATCTTGGTCTTGATGG
yllC_1	301827 - 301801	27←	ATTCCATCTTGGGCTTGAGATCATCTG
spec_raus1	-	26→	CTGAATCTTCTCCATTAGAACATAGG
spec_raus2	-	25←	TTTGATCTGTCAATGGTTCAGATAC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tab. 2.18: Oligonukleotide für die Überexpression von HtrA Proteinen.

Name	Position*	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
htrA_overex_Sa II_r	2037587-2037560	38←	ACGCGT CGACT TAAAGATTCTAAATCACCT GAACTCTTG
htrA_overex_ BamHI_f	3036406-2036432	36→	CGC GGATCC ATGAAACATCTAAAAACAT TTTACAAA
htrA_oTM_ BamHI_f	2036499-2036526	37→	CGC GGATCC AATACTCAACTAACTCAAAA AAGTAGTG
htrA_Ala_r	2037121-2037087	35←	GCTATTAACCCAGGTAACCCGGCGGCCCA TGAT
htrA_Ala_f	2037087-2037121	35→	ATCAGTGGGCCCGCCGGCGTACTGGGTTA TAGC
pQE seq fwd	-	19→	TAGGCGTATCACGAGGCC
pQE seq rev	-	21←	GTTCTTTACGATGCCATTGGG

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).
Angefügte **SalI** und **BamHI** Restriktionsschnittstellen sind markiert.

Tab. 2.19: Oligonukleotide zur Überexpression von PBP2x Proteinen mittels GST-Tag.

Name	Position	Länge [bp], Orientierung	Sequenz 5'→3'
PM11	302405-302440	45→	CCGGAATTCGGGACAGGCACTCGCTTT- GGAACAGATTTAGCGAAG
PM12	304513-304478	45←	CCGCTCGAGTTAGTCTCCTAAAGTTAATG- TAATTTTTTTAATGTC
PM37	303223-303195	29←	GTCCTCTGTAATGCCTTCTTTTGTATCTG
PM38	303129-303156	28→	CAGCGACTTTGGTCAGTGCTAAAACAGG
PM39	303987-303959	29←	CTCATCGATACAGCCGAGAAAATATAGTC
PM40	303896-303925	30→	CTCAAGTCTGGTACGGCTCAGATTGCTGA C
PM41	-	28←	GCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTC
PM44	-	27→	CCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAAC

* Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

2.4 Nährmedien

2.4.1 C-Medium (CpH8)

Das C-Medium ist ein semisynthetisches Komplexmedium CpH8 (nach Lacks und Hotchkiss, 1960), das den Nährstoffansprüchen von Streptokokken gerecht wird, da es neben einer Kohlenstoffquelle unter anderem auch wichtige Vitamine, Aminosäuren, Purine und Cholin enthält. Soweit nicht anders angemerkt, wurde dieses Flüssigmedium für die Kultivierung der Streptokokken Stämme in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Aus der Tab. 2.20 ist die Zusammensetzung des C-Mediums zu entnehmen. Tab. 2.21 zeigt die Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums. In Tab. 2.22 sind die Zusätze der Einzelkomponenten aufgelistet. Die Einzelkomponenten wurden getrennt hergestellt, autoklaviert und vor

dem Gebrauch steril zusammen pipettiert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Bei experimentellem Bedarf wurde dem C-Medium Zinkchlorid zugegeben (Tab. 2.25).

Tab. 2.20: 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	15
5 % Hefeextrakt	9

Tab. 2.21: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums.

Komponente	Menge
Pre C	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H ₂ O	ad 1.000 ml
pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und autoklavieren	
Supplement	
3 in 1 Salts	60 ml
20 % Glukose	120 ml
50 % Saccharose	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml
Alle Komponenten einzeln autoklavieren. Supplement steril zusammen pipettieren	
Adams III	
Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
0,1 M CaCl ₂	1,6 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml
Sterilfiltrieren, vor Licht geschützt lagern.	
Phosphatpuffer pH 8,0	
1 M KH ₂ PO ₄	53 ml
1 M K ₂ HPO ₄	947 ml
Autoklavieren	

Tab. 2.22: Zusätze der Einzelkomponenten des C-Mediums.

Komponente	Menge
3 in 1 Salts	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
0,1 M MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,2 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml
Autoklavieren	
Adams I	
Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl (B6)	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O	ad 1.000 ml
Sterilfiltrieren, vor Licht geschützt lagern	
Adams II	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl konz.	10 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml
Sterilfiltrieren, vor Licht geschützt lagern	

2.4.2 THY-Medium

Zur Kultivierung der *htrA*-Deletions-Transformanten, die mittels Cheshire-Kassette erstellt wurden, wurde das THY-Medium verwendet. Dieses alternative Komplexmedium setzt sich aus Todd-Hewitt (THB)-Medium (nach Todd und Hewitt, 1932) und zusätzlichem Hefeextrakt zusammen. Das THB-Medium wurde gebrauchsfertig bezogen (Becton Dickinson) und nach Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurde autoklaviertes Hefeextrakt (Endkonzentration in THY-Medium 0,5 %) zugegeben.

2.4.3 D-Blutagar

Zur Kultivierung der Streptokokken Stämme auf Festmedium diente D-Blutagar (Alloing *et al.*, 1996), welchem nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 48 °C, 3 % (v/v) defibriniertes Schafsblut (Oxoid GmbH) zugegeben wurde. Bei experimentellem Bedarf wurde der D-Blutagar mit unterschiedlichen Antibiotika zur Selektion versetzt. Zur Induktion der Proteinsynthese von GFP- PBP2x-Fusionsproteinen wurde dem Blutagar Zinkchlorid hinzugefügt (Tab. 2.25). Die Zusammensetzung des D-Blutagars ist in Tab. 2.23 dargestellt.

Tab. 2.23: Zusammensetzung des D-Agars.

Komponente	Menge
Glukose	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	20 g
H ₂ O	ad 1.000 ml
Autoklavieren	

2.4.3 Lysogeny-Broth (LB) Medium und Agar

Zur Kultivierung der in Tab. 2.3 aufgelisteten *E. coli* Stämme in Flüssigkultur wurde das LB-Medium (Bertani, 1951) verwendet. Zur Anzucht auf Festmedium wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Je nach experimentellem Bedarf wurde sowohl das LB-Medium, als auch der LB-Agar mit Antibiotika oder anderen Nährmediumzusätzen (Tab. 2.25) versetzt. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tab. 2.24 dargestellt.

Tab. 2.24: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Komponente	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1.000 ml
Autoklavieren	

2.5 Nährmediumzusätze

In Tab. 2.25 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedienzusätze aufgelistet. Von allen Antibiotika und anderen Nährmedienzusätzen, außer Zinkchlorid, wurden Stammlösungen in den angegebenen Lösungsmitteln hergestellt, mit Hilfe eines 0,2 µm Filters (Roth) sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei experimentellem Bedarf wurden diese Stammlösungen verdünnt und das Flüssig- oder Festmedium in den aufgeführten Endkonzentrationen mit diesen versetzt.

Nach Herstellung der Zinkchlorid Stammlösung wurde diese ebenfalls sterilfiltriert, bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert und anschließend dem C-Medium zugegeben.

Tab. 2.25: Verwendete Nährmedienzusätze.

Nährmediumzusatz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	verwendete Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Cefotaxim	H ₂ O	10 mg/ml	variabel
Kanamycin	H ₂ O	100 bzw. 20 mg/ml	200 bzw. 25 mg/ml
Spectinomycin	H ₂ O	20 mg/ml	20 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O	200 mg/ml	200 µg/ml
Trimethoprim	DMSO	10 mg/ml	15 µg/ml
Tetracyclin	EtOH 70 % p.a	20 mg/ml	20 µg/ml bzw.
Tetracyclin	EtOH 70 % p.a	10 mg/ml	3 oder, 2,5 µg/ml
Erythromycin	EtOH 100 % p.a	10 mg/ml	0,1 µg/ml
BSA	H ₂ O	8 %	0,072 %
CSP *	H ₂ O	20 mg/ml	100 ng/ml
Fucose	H ₂ O	20 %	0,5 %
IPTG	H ₂ O	0,1 M	1 mM bzw. 0,5 mM
Zinkchlorid	H ₂ O	30 mM	0,15 mM

Abk.: BSA (Rinderalbumin), CSP (competence stimulating peptid), IPTG (Isopropylthiogalaktosid)

**S. pneumoniae* CSP

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Stammkonservierung

Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Stämmen wurden durch das Anlegen von Glycerinkulturen dauerhaft konserviert. Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden ausschließlich Flüssigkulturen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. *S. pneumoniae* Stämme wurden hierfür in C-Medium kultiviert, bis sie eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten.

E. coli Stämme wurden hingegen in LB-Medium, bis zum Erreichen einer deutlichen Trübung, angezogen. Glycerin (99,5 %) wurde in Cryoröhrchen (Greiner Bio One GmbH) voraliquotiert. Diesem wurden exponentiell wachsende Kulturen steril zugegeben, so dass sie im Verhältnis 1:5 mit dem Glycerin gemischt wurden. Auf diese Weise wurden Aliquots zu je 250 µl hergestellt, die nach dem schockgefrieren in flüssigen Stickstoff bei -80 °C gelagert wurden. Mit Hilfe von Kontrollausstrichen auf D-Blutagar bzw. LB-Agar wurde die Reinheit der Glycerinkulturen überprüft. Sobald die Glycerinkulturen einmal aufgetaut waren, wurden sie nicht erneut eingefroren, sondern verworfen.

2.6.2 Anzuchtbedingungen

Zur Kultivierung von *S. pneumoniae*-Stämmen in Flüssigmedium wurden in der Regel zunächst Vorkulturen hergestellt, indem 6 ml C-Medium mit 100 µl Glycerinkultur beimpft wurden. Zur Anzucht von *S. pneumoniae* Stämmen, die ZnCl₂ für ihr Wachstum benötigen, wurde hierfür C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ verwendet.

Wachsen die zu untersuchenden Kolonien auf D-Blutagarplatten, wurden diese mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens unter der Sterilbank (Uniflow UVUB 1200; Biohazard, 2.4.5) in vorgewärmtes C-Medium überführt.

Bekanntlich beginnt *S. pneumoniae* ca. 5 h nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase zu lysieren. Um dieses Autolyseverhalten bei der experimentellen Vorgehensweise zu vermeiden, wurden Vorkulturen im Wasserbad mit Eis angelegt. Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr wurde der Inkubationsstart zusätzlich so gewählt, dass sich die Kulturen zu Arbeitsbeginn in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C bzw. 30 °C. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Vorkulturen in einer 1:20 Verdünnung in vorgewärmtes C-Medium überimpft und für anschließende Experimente weiter kultiviert.

Zur Anzucht von *E. coli* Stämmen wurde LB-Medium verwendet, in welchem diese schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Zur Animpfung wurde entweder eine einzelne Kolonie von einer LB-Agarplatte oder eine bereits trübe flüssige Vorkultur verwendet.

Zur Kultivierung von *E. coli* und *S. pneumoniae* Stämmen auf Festmedien wurde mit Hilfe einer Impföse ein Ausstrich der Kolonien hergestellt oder 100-200 µl einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatels ausplattiert.

2.6.3 Wachstumsmessung

Zur Ermittlung der Zelldichte von *E. coli* Kulturen wurden diese bei einer optischen Dichte von 600 nm in einem Photometer (Ultrospec 500, Biochrom Ltd.) bestimmt. Als Referenz diente eine Küvette mit sterilem LB-Medium.

Die Zelldichte von *S. pneumoniae* Kulturen wurden mit einem Nephelometer (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems) ermittelt. Gemessen wurde dabei die im rechten Winkel ausfallende Lichtstreuung (Nephelo) der Flüssigkulturen. Als Nullwert diente ein Reagenzglas mit sterilem C-Medium und als Referenz wurde ein trüber Glaseinsatz verwendet, der einer Zelldichte von $N=103,9$ entsprach.

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden zunächst Vorkulturen der zu untersuchenden *S. pneumoniae*-Stämme angesetzt (Kap. 2.6.2). Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $N=70$ wurden 400 µl steril entnommen und in 7,6 ml vorgewärmtes C-Medium mit oder ohne 0,15 mM $ZnCl_2$ überimpft, was einer 1:20 Verdünnung entspricht.

In der Regel wurde das Wachstum über einen Zeitraum von 600 min verfolgt, wobei die Zelldichten der Stämme in regelmäßigen Abständen von 30 min mit dem Nephelometer gemessen wurden. Zur Auswertung wurden die ermittelten Daten in einem Diagramm halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, um den linearen Bereich des exponentiellen Wachstums zu ermitteln. Um die Wachstumsraten und die Generationszeiten der einzelnen Kulturen zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

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

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

mit:

μ = Wachstumsrate [min^{-1}]

N = Nephelwert zum Zeitpunkt t

N_0 = Nephelwert zum Zeitpunkt t_0

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

g = Generationszeit [min]

2.6.3.1 Wachstumsanalysen mit Temperaturshift

Unterschiedliche Wachstumsbedingungen, wie z.B. verschiedene Temperaturen können sich auf das Wachstum der Streptokokken Stämme unterschiedlich stark auswirken, je nachdem wie gut sie mit Hitzestress umgehen können. Mit diesen Experimenten sollten mögliche Temperatursensitivitäten der untersuchten Stämme ermittelt werden.

Hierfür wurden zunächst Vorkulturen der Stämme, wie in Kap. 2.6.2 beschrieben, erstellt und im Eiswasserbad nach Anspringen der Zeitschaltuhr bei 30 °C inkubiert. Sobald die Vorkulturen eine Zelldichte von $N 70$ erreicht hatten, wurden 200 μl dieser trüben Kulturen in Reagenzgläser mit 7 ml vorgewärmten C-Medium überimpft. Dabei wurden pro Stamm drei identische Exemplare hergestellt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 30 °C bis die Stämme eine Zelldichte von $N 10-16$ erreicht hatten. Sobald dies der Fall war, wurde ein Temperaturshift durchgeführt, d.h. die wachsenden Bakterienkulturen wurden in Wasserbäder mit unterschiedlichen Temperaturen verteilt und weiter bei 30 °C, 37 °C und 41 °C inkubiert.

Das Wachstum der Kulturen wurde, wie bereits in Kap. 2.6.3 beschrieben, gemessen und dokumentiert. Morphologische Unterschiede der Bakterienzellen wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie (Kap. 2.6.4.1) analysiert.

2.6.3.2 Depletionsexperimente

Das Zellteilungsprotein PBP2x ist für das Wachstum und die Zellteilung der *S. pneumoniae* Zelle essentiell. In dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme konstruiert und verwendet, die eine *gfp-pbp2x* Fusion im Genom besitzen, deren Transkription über einen zinkinduzierbaren Promotor gesteuert wird (Tab. 2.1 und Tab. 2.2). Das native *pbp2x* wurde bei einigen dieser Stämme deletiert. Bei diesen Stämmen handelt es sich somit um konditionale Mutanten, bei denen die Transkription des jeweiligen *gfp-pbp2x* Fusion durch Verringerung der ZnCl_2 -Konzentration vermindert bzw. gestoppt werden kann, was sich wiederum auf das Bakterienwachstum und die Zellmorphologie auswirkt.

Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Depletionsexperimenten in Flüssigmedium untersucht. Hierfür wurde von den zu untersuchenden Stämmen zunächst Vorkulturen in 6 ml C-Medium mit 0,15 mM ZnCl_2 (Kap. 2.6.2) erstellt. Die Kulturen wurden bei 30 °C im Wasserbad bis zum Erreichen einer Zelldichte von $N 70$ inkubiert. Um das vorhandene ZnCl_2 aus dem Medium zu

entfernen, wurden die Kulturen in sterile Greiner Röhrchen überführt und 5 min bei RT und 8.500 rpm zentrifugiert (Z513 K Hermlle). Der Überstand wurde komplett verworfen und die Zellpellets in 6 ml vorgewärmten C-Medium resuspendiert. Nach einer Wiederholung dieses Waschschriffs, wurden die resuspendierten Bakterienkulturen 1:20 in 7,6 ml auf 30 °C vorgewärmtem C-Medium verdünnt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 30 °C im Wasserbad. Nachdem die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden sie erneut in einer 1:20 Verdünnung in 7,6 ml vorgewärmtes C-Medium überführt. Auch hier erfolgte die Inkubation der Bakterienkulturen bei 30 °C. Sobald die Nephelower-te der konditionalen Mutanten nicht mehr stiegen und das Wachstum demnach gestoppt war, wurde den Kulturen 0,15 mM ZnCl₂ steril zugefügt.

Während des gesamten Experiments wurde das Wachstum der Kulturen alle 30 min gemessen (Kap. 2.6.3). Des Weiteren wurde die Zellmorphologie der Depletionsmutanten in regelmäßigen Abständen phasenkontrastmikroskopisch beobachtet (Kap. 2.6.4.1).

2.6.4 Mikroskopie

2.6.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen wurden in dieser Arbeit zum einen durchgeführt um mögliche Verunreinigungen auszuschließen. Zum anderen dienten diese Analysen um morphologische Unterschiede der Zellen verschiedener Stämme bei variablen Wachstumsbedingungen zu charakterisieren.

Hierfür wurden jeweils 5µl der Flüssigkulturen mit unterschiedlichen Zelldichten steril entnommen, auf einen Objektträger pipettiert und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen bedeckt. Durch vorsichtiges Festdrücken des Deckgläschens mit einem fusselfreien Tuch, wurden die Zellen möglichst in eine Ebene gebracht.

Unter Verwendung eines 100fachen NA 1.4 Ölimmersionsobjektivs des Phasenkontrastmikroskops (Eclipse E600, Nikon) und des Immersionsöls (AppliChem GmbH) wurden die Zellen untersucht und fotografiert (Kamera: DXM 1200 C, Nikon). Die Auswertung der Phasenkontrastaufnahmen und die Messung der Zelllängen erfolgte mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2). Um die Zellzahl in Flüssigkulturen bestimmen zu können, wurde die Neubauer Zählkammer (Improved, Optik Labor) nach Herstellerangaben verwendet. Unter 40facher Vergrößerung wurden *S. pneumoniae* Zellen einer Flüssigkultur ausgezählt, die eine Zelldichte von 70 N erreicht hatte.

2.6.4.2 Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von GFP-Fusionskonstrukten

Die unterschiedlichen GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte, die in der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurden, erlauben *in vivo*-Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen.

Um diese Lokalisationsstudien durchzuführen, wurden zunächst Vorkulturen von den zu untersuchen-den Stämmen in 6 ml C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ angelegt. Diese Vorkulturen wurden bei 30 °C im Wasserbad bis zu einer Zelldichte von N 70 inkubiert. Daraufhin wurden die Kulturen 1:20 ver-

dünnt, wobei erneut frisches, vorgewärmtes C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ verwendet wurde. Die weitere Inkubation erfolgte wiederum bei 30 °C im Wasserbad. Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Kulturen fanden bei den Zelldichten N 70 und N 120 statt. Sobald die Kulturen diese Zelldichten erreicht hatten, wurde pro Kultur 5 µl steril entnommen und auf einen gereinigten Objektträger gebracht. Anschließend wurde die Probe luftblasenfrei mit dem Deckgläschen bedeckt und mit einem fusselfreien Tuch festgedrückt, um alle Zellen in eine Ebene zu bringen. Nachdem der Objektträger auf dem Objektisch des Mikroskops (Eclipse E600, Nikon) fixiert und ein wenig Immersionsöl (AppliChem GmbH) auf das Deckgläschen getropft wurden, erfolgte zunächst eine Fokussierung mit dem 100fachen Ölimmersionsobjektiv. Zuerst wurde ein Phasenkontrastbild einer geeigneten Stelle aufgenommen (Kamera: DXM 1200 C, Nikon) und die Position des Objektträgers danach nicht verändert. Sobald der Raum verdunkelt war, wurde das Durchlicht aus dem Strahlengang entfernt und der Epi-FL Filterblock B-2E/C (EX: 465-495, DM: 505, BA: 515-555; Nikon) eingesetzt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass der Strahlengang zu 100 % auf die Kamera gerichtet war und dass eine Belichtungszeit von 1-2s mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2) eingestellt war. Zeitgleich mit dem Öffnen der Blende der Fluoreszenzapparatur wurde die Aufnahme gestartet. Die Auswertung und Bearbeitung der Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2). Diese Software bot zum einen die Möglichkeit einzelne Zellen zu zählen, die Lokalisationssignale zu beurteilen und mit diesen Daten eine Statistik aufzustellen. Zum anderen war es möglich einen Maßstab in die aufgenommenen Bilder einzufügen.

Zur Aufstellung einer Statistik innerhalb der Lokalisationsstudien wurden pro analysierten Stamm jeweils die Zellen dreier Phasenkontrastbilder aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ausgezählt. Die Signale der dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen wurden ausgewertet und in charakteristische Fluoreszenzprofile unterteilt. In der aufgestellten Statistik wurden ausschließlich fluoreszierende Zellen berücksichtigt.

Alle Zellen wurden in drei Kategorien unterteilt: in komplett leuchtende Zellen, in Zellen mit einer klar erkennbaren Lokalisation und Zelle mit unklaren Profilen. Alle Zellen wurden in Anlehnung an den Zellzyklus in mehrere Kategorien unterteilt. Es wurde zwischen Zellen unterschieden, die eine kokkale Form und noch kein ausgebildetes Zellteilungsseptum besaßen, und Zellen die im Teilungsprozess bereits weiter fortgeschritten waren und eine deutliche Einschnürrung in der Zellmitte aufwiesen. Kokkale Zellen wurden je nach ermittelten Fluoreszenzsignalen ebenfalls in drei Gruppen untergliedert. Zum einen zeigten sich Zellen bei denen das Signal der GFP-PBP2x-Fusionsproteine als zwei fluoreszierende Punkte detektiert wurde. Weiterhin wurden Zellen beobachtet, die ein Fluoreszenzsignal in der Zellmitte aufwiesen, was wiederum in seiner Lage dem Zellteilungsseptum entspricht. Es wurden auch kokkale Zellen analysiert, die eine ganzheitliche zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals aufwiesen. Zellen die bereits eine deutliche Einschnürrung am Zellseptum aufwiesen, wurden in zwei weitere Gruppen unterteilt. Zum einen wurden Zellen beobachtet, bei denen eine deut-

liche Lokalisation der GFP-PBP2x-Fusionsproteine am Zellseptum detektiert wurde. Zum anderen zeigten sich Zellen, die sowohl eine eindeutige Einschnürung am Zellseptum aufwiesen, als auch eine diffuse Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas der Zelle zeigten.

2.6.5 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als Minimale Hemmkonzentration (MHK) wird die geringste Konzentration eines Antibiotikums definiert, bei der gerade kein Bakterienwachstum mehr sichtbar ist. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der MHK mit Hilfe des sogenannten Agardilutionstests, der sich an der von Andrews (Andrews, 2001) beschriebenen Methode orientiert. Bei dieser Tropfenmethode wird ein definiertes Volumen der untersuchten Bakterienkulturen auf D-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cefotaxim (Tab. 2.25) pipettiert.

Um eine mögliche Temperatursensitivität der Bakterien hinsichtlich der Resistenz zu untersuchen, wurden die Bakterienkulturen sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C in C-Medium bis zu einer Nephelo von 30 angezogen. Anschließend wurden diese 1:1.000 in 0,9 % NaCl verdünnt. Jeweils 30 µl dieser Verdünnungen wurden auf frische D-Agarplatten mit ansteigenden Konzentrationen des β -Laktamantibiotikums Cefotaxim aufgetropft. Die Abstufung der Konzentrationen erfolgte dabei in 0,02er Schritten [$\mu\text{g/ml}$].

Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C und bei 37 °C. Nach 24 h wurde die MHK abgelesen und nach 48 h wurden die Platten fotografiert (Kamera: Sony DFW-X700), die Spots wurden aus dem Bild ausgeschnitten und unter Zuhilfenahme der Software Adobe®Photoshop®Elements (Version 2.02, 190-2002) dokumentiert.

Tab. 2.26: Zusammensetzung einer D-Agar Platte zur Bestimmung der MHK.

Komponente	Menge
D-Medium	47,5 ml
Agar	0,75 g
Schafsblut	1,5 ml
Antibiotikum	variabel
H ₂ O	ad 1 ml
Gesamtvolumen	50 ml

2.6.6 Transformation von *S. pneumoniae*

2.6.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

S. pneumoniae ist ein natürlich kompetentes Bakterium, da es in der Lage ist unter natürlichen Bedingungen genetisches Material aus seiner Umgebung aufzunehmen. Dabei erreicht eine wachsende Kultur von *S. pneumoniae* R6 sein Kompetenzmaximum in der midexponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von N 30-40. Die Lage des Kompetenzpeaks variiert bei unterschiedlichen Streptokokken Stämmen jedoch und ist somit ein charakteristisches Merkmal.

Um kompetente *S. pneumoniae* Zellen herzustellen, wurden zunächst 12 ml C-Medium vorgewärmt und 108 µl BSA (Sigma-Aldrich) 0,8 % zugegeben (Endkonzentration: 0,072 %). Dieses C-Medium mit BSA wurde mit 600 µl einer wachsenden Vorkultur (Zelldichte N 50) inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (bzw. 30 °C bei den Stämmen *S. pneumoniae* C405 bzw. C606 und deren Derivaten; Tab. 2.1, Tab. 2.2) im Wasserbad. Sobald die Kulturen bis zu einer Zelldichte von N 30 hochgewachsen waren, wurden die erforderlichen Mengen der frisch hergestellten kompetenten Zellen direkt in den Transformationsansatz eingesetzt.

2.6.6.2 Transformation

Zur Transformation von *S. pneumoniae* wurden ausschließlich frische kompetente Zellen verwendet (2.6.6.1). Dafür wurden 40 µl dieser Zellen mit 360 µl C-Medium mit BSA (8 %) (Endkonzentration: 0,072 %) gemischt. Pro Transformationsansatz wurden 100-300 ng aufgereinigtes PCR-Produkt, 600-800 ng Plasmid DNA oder 5-10 µl Ligationsansatz eingesetzt.

Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz ohne DNA. Als Positivkontrolle wurden die kompetenten Zellen mit chromosomaler *S. pneumoniae* *amiA9* DNA (*str*^R; 300 ng) transformiert, wobei die anschließende Selektion in diesem Fall mit 200 µl/ml Streptomycin erfolgte.

Die Transformationsansätze wurden 30 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Innerhalb dieser Zeit findet sowohl die DNA-Aufnahme, als auch die Rekombination statt. Anschließend wurden die Ansätze für die phänotypische Expression 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Von den Transformations- und Kontrollansätzen wurden Verdünnungsreihen in 0,9 % NaCl hergestellt. Jeweils 100 µl der unverdünnten Ansätze und der geeigneten Verdünnungen wurden auf D-Blutagarplatten mit Selektionsantibiotikum (Tab. 2.25) ausplattiert. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde ebenfalls auf D-Blutagarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden für 24-48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Erhaltene Transformanten wurden in Form von Einzelkulturen abgeimpft, erneut auf D-Blutagarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und für weitere 24h inkubiert. Daraufhin wurden Transformanten durch die Herstellung von Glycerinkulturen dauerhaft konserviert und bei -80 °C gelagert (Kap. 2.6.1).

Wurden Transformationen mit dem Ziel durchgeführt, das essentielle *pbp2x* zu deletieren oder Stämme transformiert, denen das *pbp2x* bereits fehlte (Tab. 2.1, Tab. 2.2), wurde den Transformationsan-

sätzen zusätzlich ZnCl_2 (Endkonzentration: 0,15 mM) zugegeben. D-Blutagarplatten mit und ohne Selektionsantibiotikum enthielten in den Fällen ebenfalls 0,15 mM ZnCl_2 und die Selektionsplatten wurden im Anschluss bei 30 °C inkubiert. Die positiven und negativen Kontrollansätze unterlagen den gleichen Bedingungen. Alle Transformationen der Laborstämme C405 und C606 wurden ebenfalls bei 30 °C durchgeführt. Die Kultivierung solcher Transformanten erfolgte auch bei 30 °C.

Sobald nicht kompetente Laborstämme und ihre Derivate (Tab. 2.1, Tab. 2.2) transformiert wurden, wurde den Ansätzen *S. pneumoniae* CSP (competence stimulating peptide) (Endkonzentration: 100 ng/ μl) zugegeben, da dieses bekanntlich die Kompetenz induziert (Håvarstein *et al.*, 1995).

2.6.7 Transformation von *E. coli*

2.6.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Da das Bakterium *E. coli* im Gegensatz zu *S. pneumoniae* keine natürliche Kompetenz aufweist, wurde dieses nach einer vereinfachten Methode, die sich an der von Hanahan (Hanahan, 1983) orientiert, chemisch kompetent gemacht.

Dazu wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des *E. coli* Stammes inokuliert und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Bei deutlich erkennbarer Trübung dieser Vorkultur, wurde diese in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte weiterhin bei 37 °C auf dem Schüttler (Innova™ 2300 Platform Shaker, New Brunswick Scientific Co.). Die optische Dichte der wachsenden Kultur wurde in regelmäßigen Abständen ermittelt (Kap. 2.6.3). Sobald die Bakterienkultur eine OD_{600} von 0,5 erreicht hatte, wurde diese in sterile 50 ml Greiner Röhrchen überführt und direkt auf Eis gestellt. Anschließend folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 8.000 rpm und 4 °C in der Kühlzentrifuge (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde verworfen, jedes einzelne Pellet in 16 ml kaltem TFB1-Puffer gelöst und 90 min auf Eis gelagert. Die Zusammensetzung des Puffers TFB1 und alle weiteren Lösungen, die zur Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen und Transformation verwendet wurden, sind der Tab. 2.27 zu entnehmen.

Tab. 2.27: Lösungen zur Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen und Transformation.

Komponente	Menge / Konzentration
TFB1-Puffer	
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern	

Komponente	Menge / Konzentration
TFB2-Puffer	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %
pH 8 mit NaOH einstellen, nach dem Autoklavieren bei 4 °C lagern	
Psi-Broth	
LB-Medium	
MgSO ₄	4 mM
KCl	10 mM
Alle Komponenten autoklavieren und steril zusammenpipettieren	
X-Gal (Applichem)	60 µg/ml
vor Zugabe zum Agar in Dimethylformamid (0,5 ml) lösen	

Danach wurde erneut, wie bereits beschrieben zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und die Bakterienpellets in 1,6 ml eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen. Nach dem Aliquotieren der Suspension in 100 µl Portionen, wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Zur Reinheitskontrolle wurden zusätzlich Kontrollausstriche auf LB-Agar hergestellt.

2.6.7.2 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden Aliquots der chemisch kompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Jeweils 100 µl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA (entweder 5 µl Ligationsansatz oder 2 µl Plasmid DNA) gemischt. Dem Kontrollansatz wurde hingegen keine DNA zugegeben. Die Transformationsansätze wurden nach dem Mischen 20 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde ein Hitzeschock durchgeführt, wobei die Ansätze 90 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und danach direkt wieder auf Eis gestellt wurden. Zur phänotypischen Expression wurde jeder Transformationsansatz mit 1 ml frisch angesetztem Psi-Broth vermengt und daraufhin 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Von den Zellen wurden Verdünnungsreihen in 0,9 % NaCl hergestellt und je 200 µl der unverdünnten Zellen und der geeigneter Verdünnungen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum und gegebenenfalls mit X-Gal ausplattiert. Zur Kontrolle der Lebendkeimzahl wurden Verdünnungen der Zellen ebenfalls auf LB-Agarplatten ohne Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung, Aufreinigung und Nachweis von Nukleinsäuren

2.7.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Isolierung der chromosomalen DNA aus *S. pneumoniae* Stämmen orientiert sich an der Methode nach Marmur (Marmur, 1961). Diese Methode ist zwar schnell, birgt allerdings die Gefahr der Fragmentierung der chromosomalen DNA durch Scherkräfte.

In Tab. 2.28 sind alle Lösungen, die zur Isolierung der chromosomalen DNA benötigt wurden, dargestellt.

Für die Isolation wurden 6 ml einer Streptokokken Kultur mit der Zelldichte von N 70-80 durch das 10-minütige Zentrifugieren bei 4 °C und 8.500 rpm (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Rotor 3046) geerntet. Nachdem vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter NaCl (0,9 %) gelöst und in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG) überführt. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (Centrifuge 5415 C, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 180 µl TE-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde den Proben 200 µl 2 % SDS zugegeben. Durch Invertieren wurden diese gemischt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer vollständigen Lyse, wurde zum Verdau der Proteine 100 µl Proteinase K-Lösung zugegeben und weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamlyalkohol (25:24:1) durchgeführt, um restliche Proteine aus den Proben zu entfernen. Hierfür wurden jedem ERG 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamlyalkohol zugegeben und die Proben 30 min auf einem Eppendorfschüttler (Vortex Genie, Scientific Industries) gerüttelt.

Tab. 2.28: Lösungen zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*.

Komponente	Menge / Konzentration
NaCl	0,9 %
TE-Puffer (1x)	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit HCl einstellen	
RNase-Lösung	
Tris	10 mM
NaCl	15 mM
pH 7,5 einstellen, autoklavieren	
RNase A (Roth)	10 mg/ml
15 min bei 100 °C kochen, bei -20 °C lagern	
SDS (Natriumdodecylsulfat)	2g SDS in 100 ml H ₂ O gelöst

Komponente	Menge / Konzentration
Proteinase K-Lösung (Roth) bei -20 °C lagern	20 mg/ml H ₂ O
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	
Phenol	50 ml
Chloroform	48 ml
Isoamylalkohol	2 ml
20 ml 1xTE zum Equilibrieren zugeben, dunkel bei 4 °C lagern	
Ethanol	70 % p.a.
Isopropanol	100 % p.a.

Nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min bei RT und 14.000 rpm (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) wurde die wässrige Oberphase mit der gelösten DNA vorsichtig abpipettiert, in ein neues ERG überführt und mit 25 µl RNase A-Lösung versetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben für 5 min bei 37 °C im Wasserbad gehalten. Die Phenol-Extraktion wurde wiederholt und der Oberphase wurde zur Fällung der DNA 500 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurden die Proben zunächst 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden sie 10 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand komplett verworfen, die DNA-Pellets zweimal mit 200 µl Ethanol gewaschen und bei 55 °C 10 min getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und entweder 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die langfristige Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.7.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* Stämmen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen) isoliert. Die verwendete Methode basiert dabei auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit einer anschließenden Absorption der Plasmid-DNA an einer Silica-Membran.

Dazu wurden 6 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum mit einer einzelnen *E. coli* Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer Inkubation von ca. 16 h wurde die angewachsene Kultur 10 min bei RT und 8.000 rpm herunterzentrifugiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mit dem Kit isoliert.

2.7.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese, einer Standardmethode nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989 und Referenzen) aufgetrennt und nachgewiesen. Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen sind und deshalb nach Anlegen einer Spannung durch ein Agarosegel, das sich in einer ionischen Pufferlösung befindet, von der Kathode zur Anode wandern. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit, sowohl von der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration, als auch von der Größe und Konformation der aufzutrennenden DNA-Fragmente abhängig.

Die Konzentration der verwendeten Agarose orientierte sich demnach an der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren. Waren die untersuchten Fragmente ca. 1 kb groß, wurden 1 %ige Agarosegele benutzt. Bei kleineren Fragmenten wurden Agarosegele von 1,5-2 % verwendet. Sobald die Größe 6 kb überschritt, kam 0,8 %ige Agarose zum Einsatz.

Die entsprechende Menge an Agarose (LE Agarose, Biozym Scientific GmbH) wurde abgewogen und durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer (Tab. 2.29) in der Mikrowelle gelöst. Horizontale Gelschritten wurden an den Seiten mit Klebeband abgedichtet und die etwas abgekühlte Agarose gegossen. Kämme, die Probenaschen formten, wurden in diese eingesetzt. Nach vollständigem Gelieren der Agarose wurden die Kämme entfernt und das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer wurde so mit 1x TAE-Puffer gefüllt, dass das Gel knapp bedeckt war.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Loading Dye (Fermentas) und H₂O versetzt. Die Marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) und GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) dienten als Größenstandards. Die Gelelektrophorese erfolgte bei elektrischen Spannungen von 80-120 V. Die Laufzeit des Gels war von der erwünschten Auftrennung der aufgetragenen Fragmente abhängig. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele 20-30 min im Ethidiumbromid-Bad (Konzentration ca. 0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend zur Kontrastverstärkung 5 min in Wasserbad entfärbt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die Struktur der Nukleinsäuren interkaliert. Mittels Anregung durch UV-Licht wurden die DNA bzw. RNA-Fragmente im Gel auf einem Transilluminator (Oncor® M.20, Appligene) sichtbar gemacht, zur Dokumentation fotografiert (Digital-store Duo-Systems, Intas) und gedruckt (Druckermodell P68E, Mitsubishi Electric Corporation). In Tab. 2.29 sind die verwendeten Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese aufgelistet.

Tab. 2.29: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Menge / Konzentration
TAE-Puffer (50x)	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml
vor Gebrauch 1:50 verdünnen	
Ethidiumbromid	
Stocklösung	10 mg/ml
Gebrauchslösung	5 µg/ml

2.7.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die in eine Transformation, Klonierung oder in eine weitere enzymatische Reaktion eingesetzt wurden, mussten zunächst aufgereinigt werden, um überschüssige dNTPs, Oligonukleotide, Enzyme und Salze zu entfernen. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit JETquick-PCR Purification Spin Kit 250 (Genomed), dem Ron's PCR-Pure Kit (Bioron GmbH) oder dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben.

2.7.1.5 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

PCR-Produkte, die Nebenprodukte aufwiesen, oder geschnittene Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines präparativen Gels und dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) aus der Agarose eluiert.

Das Gel wurde in drei Bereiche unterteilt. Der mittlere Bereich enthielt eine große Probestasche mit dem größten Probevolumen. Mehrere Taschen des Kamms wurden mit Klebeband zusammengeklebt um eine größere Probestasche zu formen, da der komplette PCR-Ansatz auf ein präparatives Gel aufgetragen wurde. Die flankierenden kleinen Probestaschen wurden ebenfalls mit der Probe versehen. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte, wie unter Kap. 2.7.1.3 bereits beschrieben. Dabei wurde die angelegte Spannung von 80 V nicht überschritten, um eine bessere Auftrennung zu gewährleisten. Nach vollendeter Elektrophorese wurde das Gel in drei Teile zerteilt und die außen liegenden Agarosestreifen im Ethidiumbromidbad gefärbt.

An den detektierten, gewünschten DNA-Banden wurde das Gel mit Markierungen versehen. Nach dem Zusammenlegen der drei Agarosestreifen, konnte die Probe, die sich im mittleren ungefärbten Bereich befand, mit einem sterilen Skalpell blind ausgeschnitten werden. Auf diese Weise wurde auf das DNA-schädigende Färben mit Ethidiumbromid verzichtet. Die Elution der Nukleinsäuren aus der Agarose erfolgte weiterhin nach Herstellerangaben des Kits.

2.7.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-RNA-Lösungen wurde ein Spektralphotometers NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) verwendet. Dabei wurde die Absorption der DNA-Lösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Nukleinsäuren besitzen bei der Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, was auf die Absorption der aromatischen Ringe der Basen zurückzuführen ist.

Für eine Konzentrationsmessung wurde 1 µl der Nukleinsäuren-Lösung auf eine optische Kabel-Faser pipettiert. Als Referenz diente das jeweilige Lösungsmittel der Probe. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf folgenden Werten:

dsDNA 1 OD₂₆₀ = 50 ng/µl

ssDNA 1 OD₂₆₀ = 33 ng/µl

Zusätzlich wird bei der Messung der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt, der wiederum als Maß für die Reinheit der DNA-Proben dient. Bei reiner DNA sollte OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Liegt der gemessene OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert darunter, kann auf eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen geschlossen werden, da diese bei einer Wellenlänge von 280 absorbieren.

Zur Bestimmung der Konzentration einer RNA-Lösung, wurde 1 µl einer geeigneten Verdünnung benötigt. Die Absorption der Lösung wurde bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Dabei basiert die Konzentrationsbestimmung auf folgenden Werten:

ssRNA: 1 OD₂₆₀ = 40 ng/µl

Der Grad der Reinheit der RNA wurde durch OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ angezeigt. Dabei zeigten OD₂₆₀/OD₂₃₀ von > 2 und OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 2 einen ausreichend hohen Reinheitsgrad der Probe an.

2.7.2 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

2.7.2.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen und mit den jeweiligen Reaktionspuffern nach Herstellerangaben verwendet. Geschnitten wurden sowohl PCR-Produkte, als auch Plasmide in analytischen und präparativen Restriktionsansätzen, wobei die Inkubation 1-3 h oder über Nacht im Wasserbad bei 37 °C erfolgte. Falls nötig erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Reaktionsenzyme für 20 min bei 60 °C. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.7.1.3) überprüft.

2.7.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde in der vorliegenden Arbeit, sowohl die T4 DNA Ligase von Invitrogen (1 U/µl), als auch die T4 DNA Ligase (NEB) mit den jeweiligen Reaktionspuffern nach Herstellerangaben verwendet. Bei blunt-end Ligationen eines Inserts mit dem Vektor pGEM-T-Easy (Promega) wurde ebenfalls nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Ligationen wurden in einem molekularen Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2 angesetzt. Falls die Transformation nicht direkt im Anschluss an die Ligation stattfand, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.7.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) stellt eine *in vitro*-Methode zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten dar (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Ein PCR-Ansatz beinhaltet neben einer thermostabilen DNA-Polymerase, freie dNTPs, einen geeigneten Reaktionspuffer und zwei synthetische Oligonukleotide mit gegensätzlicher Orientierung. Diese begrenzen den DNA-Abschnitt der amplifiziert werden soll, dienen als Startpunkt für die Neusynthese der DNA und werden in dem Ansatz im Überschuss eingesetzt.

In der PCR laufen drei aufeinanderfolgende, temperaturabhängige Schritte ab. Im ersten Schritt der PCR findet die Denaturierung statt. Dabei wird die doppelsträngige DNA durch das Erhitzen auf 98 °C in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. In einem zweiten Schritt lagern sich die verwendeten Oligo-

nukleotide an den komplementären DNA-Einzelstrang an. Dieser Prozess wird als Annealing bezeichnet. Die Annealingtemperatur liegt deutlich unter der Temperatur der Denaturierung und ist, sowohl von der Länge, als auch von dem GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide abhängig. Der dritte Schritt einer PCR nennt sich Elongation und findet bei dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, in der Regel bei 72 °C, statt. Bei der Elongation wird ausgehend vom 3'-OH-Enden der Oligonukleotide ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der zur Template-DNA komplementär ist. Dabei ist die Elongationszeit zum einen von der Länge der zu amplifizierenden DNA abhängig und zu anderen von der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase.

Die einzelnen Schritte der PCR werden in einem Thermocycler (T1 Thermocycler, T-Gradientcycler; Biometra) zyklisch wiederholt. Nach durchschnittlich 29facher Wiederholung lag der amplifizierte DNA-Abschnitt in sehr hoher Kopienzahl vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit vier unterschiedlichen DNA-Polymerasen gearbeitet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

RedGoldstar™ DNA-Polymerase

Die RedGoldstar™ DNA-Polymerase (Eurogentec), die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, besitzt zwar eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und infolgedessen keine Korrekturlese- (proofreading) Funktion. Laut Herstellerangaben arbeitet diese DNA-Polymerase mit einer Synthesegeschwindigkeit von 1 min/1kb und ist in der Lage DNA-Fragmente mit einer Größe bis zu 12 kb zu synthetisieren. In Tab. 2.30 ist die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes und in Tab. 2.31 das verwendete PCR-Programm der RedGoldstar™ DNA-Polymerase dargestellt.

Tab. 2.30: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der RedGoldstar™ DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
10x Reaktionspuffer	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	16 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA (~500 ng)	*0,5-5 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth)	4 µl
RedGoldstar™ DNA-Polymerase (5 U/ µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 100 µl

*Abhängig von der Konzentration der Template DNA

Tab. 2.31: PCR-Programm bei Verwendung der RedGoldstar™ DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94 °C	2 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	Primer T _m -5 °C*	30 s
4. Elongation	72 °C	1 min/kb
5. Vollständige Elongation	72 °C	10 min
6. Pause	10 °C	∞

* Die Annealingtemperatur lag 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Die Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt.

DreamTaq™ DNA-Polymerase

Die DreamTaq™ DNA-Polymerase besitzt ebenso wie die RedGoldstar™ DNA-Polymerase nur eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität und die gleiche Synthesegeschwindigkeit. Die DNA-Polymerase lag bereits als fertiger MasterMix-Lösung vor und konnte direkt verwendet werden. Tab. 2.32 zeigt die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes und in Tab. 2.33 ist das verwendete PCR-Programm der DreamTaq™ DNA-Polymerase dargestellt.

Tab. 2.32: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der DreamTaq™ DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
DreamTaq Master-Mix	25 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA*	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

* Abhängig von der Konzentration der Template DNA

Tab. 2.33: PCR-Programm bei Verwendung der DreamTaq™ DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. Annealing	Primer T _m -5 °C*	30 s
4. Elongation	72 °C	1 min/kb
5. Vollständige Elongation	72 °C	5 min
6. Pause	10 °C	∞

* Die Annealingtemperatur lag 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Die Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt.

Beide Polymerasen fanden Verwendung, wenn PCRs zur Sequenzierung hergestellt wurden oder wenn die korrekte Integration in eine Plasmid oder in ein Genom überprüft wurde. Als Template diente dabei entweder chromosomale oder Plasmid-DNA.

iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase

Die iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase (BioRad) hat neben der 5'→3'-Exonuklease-Aktivität auch eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität vorzuweisen. Dank dieser Fähigkeit können falsch eingebaute Nukleotide erkannt und entfernt werden. Die entstandene Lücke wird anschließend durch erneute Polymerisation mit dem richtigen Nukleotiden gefüllt. Die iProof DNA-Polymerase besitzt zudem eine höhere Prozessivität und benötigt zur Amplifikation eines 1 kb großen DNA-Fragments 15-30 s. Sobald DNA-Abschnitte amplifiziert wurden, die in Klonierungs- und Transformationsexperimenten oder in einer Überlappenden PCR Verwendung fanden, wurde die iProof DNA-Polymerase verwendet.

In Tab. 2.34 ist die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes mit der iProof DNA-Polymerase dargestellt. Tab. 2.35 zeigt das verwendete PCR-Programm.

Tab. 2.34: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der iProof DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
5x HF Reaktionspuffer	10 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA (~50-200 ng)	*0,5 -2 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth)	1 µl
iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

*Abhängig von der Konzentration der Template DNA

Tab. 2.35: PCR-Programm bei Verwendung der iProof DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
2. Denaturierung	98 °C	10 s
3. Annealing	Primer T _m -5 °C*	30 s
4. Elongation	72 °C	30 s/kb
5. Vollständige Elongation	72 °C	5 min
6. Pause	10 °C	∞

* Die Annealingtemperatur lag 5 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt.

Pfu DNA-Polymerase

Die native *Pfu* DNA-Polymerase (Thermo Scientific) stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*. Diese Polymerase besitzt Dank ihrer Korrekturleseaktivität eine sehr geringe Fehlerrate von nur 2,6 x 10⁻⁶ und eine Syntheserate von 1kb/2min. Diese DNA-Polymerase wurde benutzt, wenn eine Amplifikation mit der iProof DNA-Polymerase zuvor nicht funktioniert hatte. Erstellte PCR-Produkte konnten

anschließend sowohl transformiert, als auch kloniert werden. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes, sowie das entsprechende PCR-Programm mit der *Pfu* DNA-Polymerase sind in den Tab. 2.36 und Tab. 2.37 aufgeführt.

Tab. 2.36: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
10x Reaktionspuffer mit MgSO ₄	10 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA (~50-200 ng)	*1-2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth)	1 µl
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2 U/ µl)	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

* Abhängig von der Konzentration der Template DNA

Tab. 2.37: PCR-Programm bei Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. Annealing	Primer T _m -5 °C*	30 s
4. Elongation	72 °C	2 min/kb
5. Vollständige Elongation	72 °C	5-15 min
6. Pause	10 °C	∞

* Die Annealingtemperatur lag 5 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt.

Kolonie-PCR

Kolonie-PCRs wurden durchgeführt, um *E. coli* Transformanten auf eine schnelle Art und Weise zu überprüfen. Dabei konnte auf die Isolation von Plasmid-DNA verzichtet werden. Stattdessen wurde ein Teil der zu untersuchenden *E. coli* Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Der Schritt der Initialen Denaturierung der PCR dauerte dabei 5 min.

Kultur-PCR

Sobald die richtige Integration in das *S. pneumoniae* Genom von Transformanten schnellstmöglich untersucht werden sollten, wurden Kultur-PCRs durchgeführt, da dabei auf die Isolation der chromosomalen DNA der Transformanten verzichtet werden konnte.

Zur Durchführung der Kultur-PCR wurden 100 µl einer wachsenden *S. pneumoniae* Kultur mit einer Zelldichte von ca. N 70 für 5 min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) herunter zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 50 µl H₂O gelöst und anschließend 1 µl dieser Suspension direkt in einen PCR-Ansatz eingesetzt.

Die Kolonie- bzw. Kultur-PCRs wurden sowohl mit der RedGoldstar DNA-Polymerase, der DreamTaqTM DNA-Polymerase als auch mit der iProof DNA-Polymerase durchgeführt.

Überlappende PCR

Die Methode der Überlappenden PCR wurde verwendet, um verschiedene Konstrukte herzustellen. Auf diese Art und Weise wurden beispielsweise unterschiedliche Promotorregionen mit dem Gen *htrA* fusioniert oder ein *htrA*_{S234A}-Inaktivierungsderivat in *S. pneumoniae* generiert.

Es handelt sich bei der überlappenden PCR um eine Variante einer konventionellen PCR, bei der zwei bis drei zuvor amplifizierte PCR-Produkte, die homologe Überhänge besitzen, so zusammengefügt werden, dass ein DNA-Fragment über die komplette Länge entsteht.

Zunächst wurden in einzelnen herkömmlichen PCRs (Kap. 2.7.2.3) mit Hilfe von speziellen Oligonukleotiden 2-3 PCR-Produkte generiert. Diese Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass bei den PCRs DNA-Fragmente entstanden, deren Enden einen 20-40 bp großen komplementären Bereich zu dem jeweils anderen DNA-Fragment besaßen. Diese einzelnen DNA-Fragmente wurden nach der Aufreinigung mit Hilfe eines Aufreinigungs-Kit (Kap. 2.7.1.4) oder durch ein präparatives Agarosegel (Kap. 2.7.1.5) in äquimolaren Mengen als Template in die überlappende PCR eingesetzt. Für die Überlappende PCR wurden ausschließlich die iProof und *Pfu* DNA-Polymerasen verwendet.

Nach der Denaturierung der DNA lagen die einzelnen PCR-Produkte als Einzelstränge vor. Der erste Zyklus der überlappenden PCR wurde ohne Zugabe von Oligonukleotiden durchgeführt. Bei diesem Schritt der Überlappenden PCR, die als „Auffüllreaktion“ bezeichnet wird, lagerten sich die komplementären Bereiche der unterschiedlichen eingesetzten Fragmente aneinander. Durch die DNA-Polymerase wurden die fehlenden Bereiche durch Neusynthese von DNA aufgefüllt. Dabei fungierten die Enden der DNA-Fragmente selbst als Primer für die DNA-Polymerase und es entstand ein PCR-Produkt mit voller Länge. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Oligonukleotide, die zur Amplifikation des großen PCR-Produkts benötigt wurden. Die weiteren Schritte des PCR-Programms sind identisch mit einem Standardprogramm. Die Tab. 2.38 zeigt die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Überlappende PCR. In Tab. 2.39 ist das PCR-Programm für eine Überlappende PCR dargestellt.

Tab. 2.38: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Überlappenden PCR.

Komponente	Menge
5x HF Reaktionspuffer	10 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Template DNA 1 (~50-200 ng)	*0,5-2 µl
Template DNA 2 (~50-200 ng)	*0,5-2 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth)	1 µl
iProof TM DNA-Polymerase (2 U/ µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 45 µl
Nach dem ersten Zyklus (s. Tab. 2.39) zugegeben:	
Forward Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl

*Abhängig von der Konzentration der Template DNA

Tab. 2.39: PCR-Programm für die Überlappende PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung	98 °C	5 min
2. Annealing	50 °C	1 min
3. Elongation	72 °C	1 min
4. Pause, Primerzugabe	30 °C	5 min
5. Vollständige Denaturierung	98 °C	1 min
6. Denaturierung	98 °C	10 s
7. Annealing	Primer T _m -5 °C*	30 s
8. Elongation	72 °C	30 s/kb
9. Vollständige Elongation	72 °C	5 min
10. Pause	10 °C	∞

* Die Annealingtemperatur lag 5 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Schritte 6-8 wurden 29x wiederholt.

2.7.2.4 DNA-Sequenzierung

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen erfolgten durch den Sequenzierservice Seq-IT im Westfalz Klinikum in Kaiserslautern.

Pro Sequenzreaktion wurden 2 µg des aufgereinigten PCR-Produkts oder der Plasmid-DNA und 10 µl des Oligonukleotids (10 pmol/µl) zur Weiterverarbeitung an den Sequenzierservice geschickt. Die Sequenzierung der Proben erfolgte nach der Methode, die auf der von Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) basiert. Die Sequenzdaten wurden in Form einer seq-Datei (Textdatei) und einer ab1-Datei versendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe folgender Computersoftware:

- Clone Manager 7.0, Scientific and Educational Software
- Chromas 1.45; 1996-1998 Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia
- Verwendete Datenbanken: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/>

2.7.3 Chromosomale Modifikation von *S. pneumoniae*

2.7.3.1 Herstellung von *htrA*-Deletionsderivaten mit Hilfe einer Kanamycin-Resistenzkassette

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen *htrA*, das für eine Serinprotease kodiert, in zahlreichen *S. pneumoniae* Stämmen mit Hilfe dieser Methode deletiert. Die Herstellung von Deletionsmutanten durch Integration einer Kanamycin-Resistenzkassette ist eine gängige und vor allem schnelle Methode Gene zu inaktivieren. Als Ausgangsstamm diente dabei *S. pneumoniae* R6 *htrA::aphIII* (Schäfer, 2007; Tab. 2.1). Bei diesem Stamm wurde das Gen *htrA* durch eine Insertionsdeletion größtenteils deletiert und durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Dabei wurde der Stamm so erstellt, dass nach der Integration des Konstrukts in das Genom von *S. pneumoniae* nur die Promotorregion von

htrA vor der Kanamycin-Resistenzkassette und die letzten fünf Nukleotide von *htrA* nach der Resistenzkassette erhalten bleiben. In Abb. 2.1 ist die Insertionsdeletion des *htrA* Gens dargestellt.

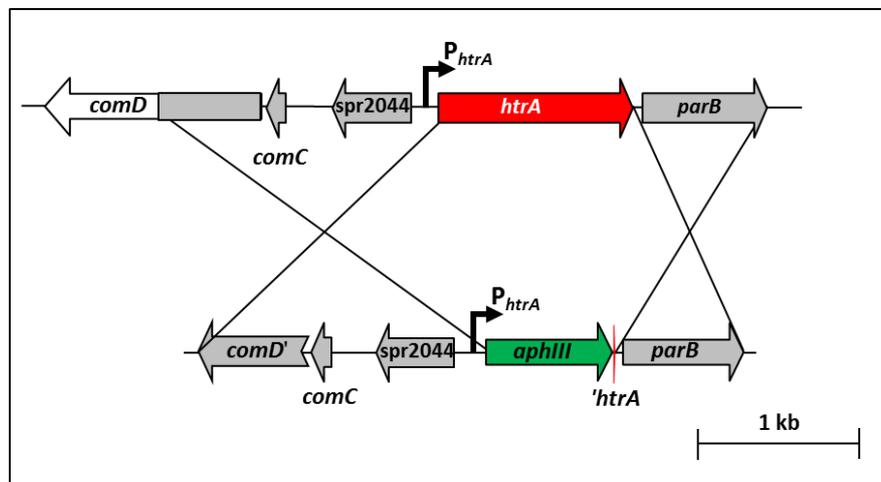


Abb. 2.1: Insertionsdeletion des *htrA* Gens mittels Integration einer Kanamycin-Resistenzkassette. Die einzelnen Gene und ihre Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. **Oben:** Genetische Organisation von *htrA* und seiner Umgebung. Das Gen *htrA* ist mit *parB* in einem Operon organisiert und steht unter der Kontrolle des CiaR-regulierten Promotor P_{htrA} . **Unten:** Genetische Organisation des *htrA* Locus nach der Insertionsdeletion von *htrA* mittels Kanamycin-Resistenzkassette (grün). Durch homologe Rekombination über die Gene *comD'*, *comC*, *spr2044* und *parB* (grau) integriert sich das Konstrukt in das Genom von *S. pneumoniae* und ersetzt *htrA* größtenteils. Die Promotorregion von *htrA* und die letzten fünf Nukleotide des Gens bleiben erhalten (roter Strich). Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

Um das Gen *htrA* zu deletieren, wurde zunächst die Kanamycin-Resistenzkassette mit den flankierenden Bereichen für die homologe Rekombination (*comD'*, *comC*, *spr2044* und *parB*) aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *htrA::aphIII* in einer Kultur-PCR mit der iProof DNA-Polymerase (Kap. 2.7.2.3) und den Oligonukleotiden *htrA_ko_1* und *N17* (Tab. 2.8) amplifiziert. Zur Kontrolle der PCR wurde die Größe des Produkts (2667 bp) mittels Agarose Gelelektrophorese (Kap. 2.7.1.3) überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (Kap. 2.7.1.4) und die Konzentration am NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies; Kap. 2.7.1.6) bestimmt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in frische kompetente Zellen der Stämme DKL031 (Tab. 2.1), KPKL71 und KPKL81 (Tab. 2.2) transformiert. Die Selektionsplatten enthielten 200 µg/ml Kanamycin und wurden 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Erhaltene Transformanten wurden auf frische D-Blutagarplatten mit Kanamycin überstrichen, konserviert und eine erfolgreiche Deletion mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.7.2.3) überprüft. Dafür wurden die Primer *htrA_ko_6* und *spo0J_1* (Tab. 2.8) verwendet. Bei erfolgter Deletion von *htrA* wurde ein PCR-Produkt mit der Größe von 2924 bp amplifiziert. In einer negativen Kontroll-PCR wurde eine Kultur *S. pneumoniae* R6 eingesetzt, welche ein komplettes *htrA*-Gen besaß. Dabei wurde ein PCR-Produkt von 3294 bp amplifiziert. Pro erstellten Stamm wurden von 2-3 Transformanten PCR-Produkte aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt. Sequenziert wurde mit den Primern *htrA_ko6* und *spo0J_1* (Tab. 2.8), die das erstellte PCR-Produkt von beiden Seiten begrenzen. Zusätzlich wurde ebenfalls mit den Primern *KO-Kan_P2* und *KO-Kan_P33_for* (Tab. 2.8) sequenziert.

In den erstellten Stämmen *S. pneumoniae* KPKL09, KPKL711, KPKL811 (Tab. 2.2) und in den verwendeten *S. pneumoniae* Stämmen DKL171, DKL151 und DKL123 (Tab. 2.1), die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde das Gen *htrA* zuvor mit dieser Methode deletiert.

2.7.3.2 Herstellung von *htrA*-Deletionsderivaten mittels Cheshire-Kassette

Im Verlauf dieser Dissertation wurden das Gen *htrA* mit Hilfe einer sich selbst deletierenden Cre-*loxP-ermAM* Kassette (Cheshire-Kassette; Weng *et al.*, 2009) deletiert. Die Cheshire-Kassette ermöglicht die Deletion von ganzen Genen mit einer eleganten Methode, bei deren Verwendung lediglich eine kleine Narbe (*lox72*) im Genom zurückbleibt. Diese Kassette besitzt zum einen ein temporärer Erythromycin Resistenzmarker *ermAM*, der durch homologe Rekombination über Doppel-Crossover in das Genom eingebracht wird und dabei das gewünschte Gen deletiert. Zum anderen besitzt die Cheshire-Kassette die Mittel dafür, sich selbst zu entfernen. Sie beinhaltet das *cre*-Gen, welches unter der Kontrolle des Fucose-induzierbaren Promotors P_{fcsk} steht. Das Gen *cre* kodiert für eine Rekombinase, die wiederum an spezifischen Erkennungssequenzen (*loxP*-Elementen) bindet und die dazwischen liegende DNA ausschneidet. Das *cre/lox* System stammt dabei aus dem Bakteriophagen P1. Nach Zugabe von Fucose kommt es somit zur Exzision der Cheshire-Kassette und zum Verlust der Antibiotikaresistenz.

Die Abb. 2.2 zeigt den *htrA*-Lokus vor und nach der Deletion mit der Cheshire-Kassette. In diesem Fall bilden die ersten sechs und die letzten acht Nukleotide von *htrA* zusammen mit dem *lox72* Element die kleine Narbe, die nach der Deletion im Genom erhalten bleibt.

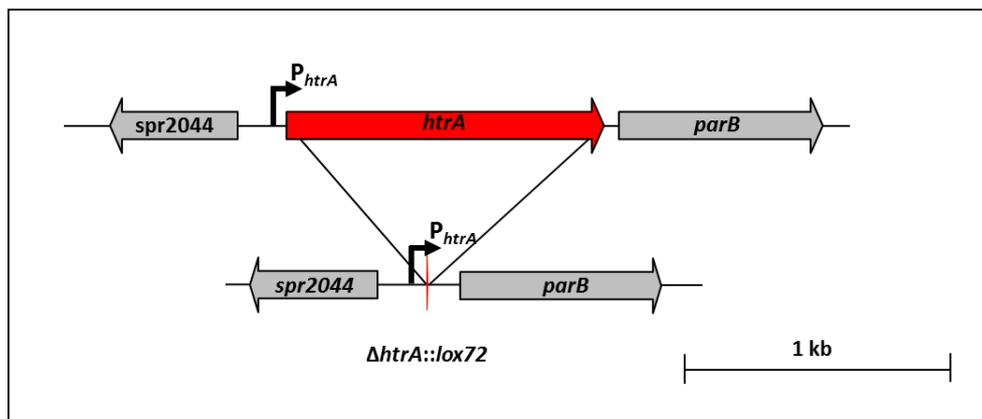


Abb. 2.2: Deletion des *htrA* Gens mittels Cheshire-Kassette. Die einzelnen Gene und ihre Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. **Oben:** Genetische Organisation von *htrA* und seiner Umgebung. Das Gen *htrA* ist mit *parB* in einem Operon organisiert und steht unter der Kontrolle des CiaR-regulierten Promotor P_{htrA} . **Unten:** Genetische Organisation des *htrA* Locus nach der Deletion von *htrA* mittels Cheshire-Kassette und Exzision der Cheshire-Kassette nach der Fucose Kurierung. Die Promotorregion von *htrA* bleibt erhalten. Die ersten sechs Nukleotide und die letzten acht Nukleotide von *htrA* bilden zusammen mit dem *lox72* Element die kleine Narbe die im Genom von *S. pneumoniae*, die nach erhalten bleibt (als roter Strich dargestellt). Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

In Abb. 2.3 ist die Vorgehensweise bei der Deletion des *htrA* Gens mittels Cheshire-Kassette schematisch veranschaulicht.

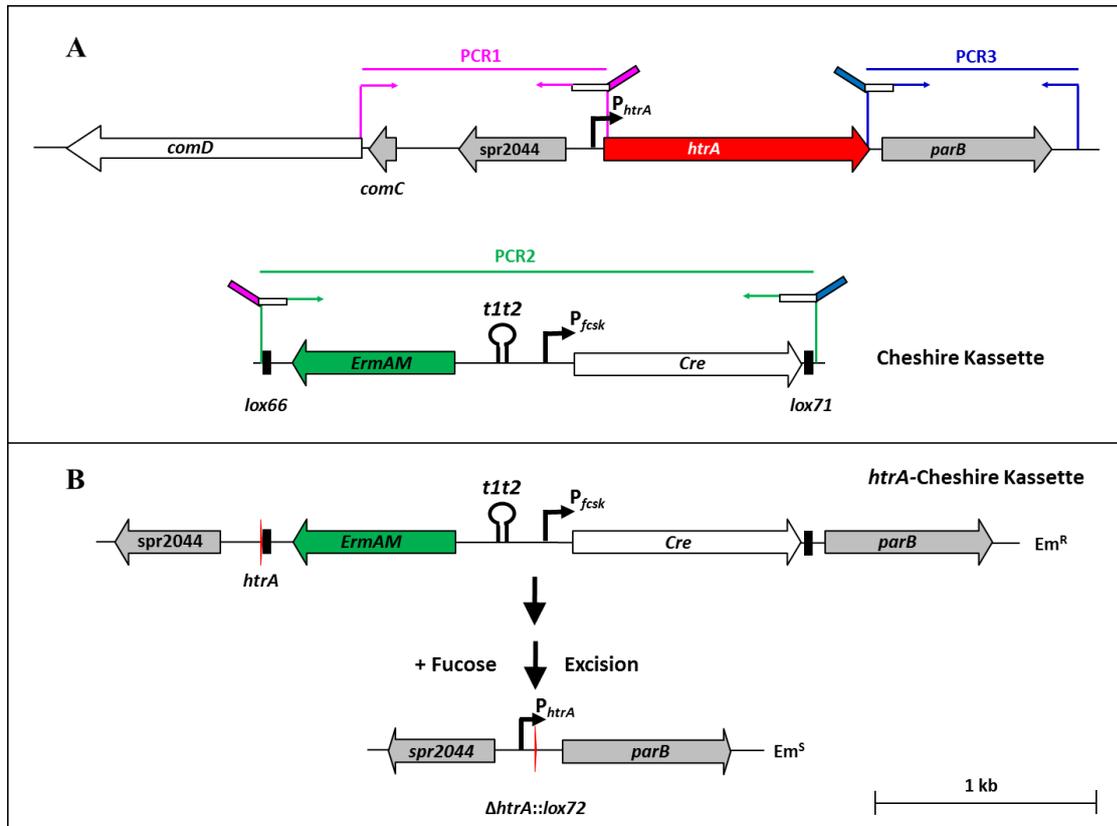


Abb. 2.3: Vorgehensweise bei der Deletion des *htrA* Gens mittels Cheshire-Kassette. Die einzelnen Gene und ihre Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. Vorhandene Promotor (\blacktriangleright) und Terminatorstrukturen (Ⓢ) sind angezeigt. **A:** Die drei durchgeführten PCRs und die Lage der jeweiligen Oligonukleotide sind farbig unterlegt. Farbige Rechtecke an den dargestellten Oligonukleotiden markieren die angefügten Restriktionsschnittstellen: *MluI*: \blacksquare und *NcoI*: \blacksquare . Die einzelnen PCR-Produkte wurden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten, ligiert und transformiert. Die homologe Rekombination findet über die Gene *comC*, *spr2044* und *parB*, die in der Abbildung grau unterlegt sind, statt. Schwarze Boxen kennzeichnen die Lage der *lox66*, bzw. *lox71* Elemente. **B Oben:** Zu sehen ist die *htrA*-Cheshire-Kassette nach der Integration in das *S. pneumoniae* Genom. Dabei vermittelt *ErmAM* (grün) Resistenz gegen Erythromycin. **B Unten:** Dargestellt ist die genetische Organisation des *htrA*-Lokus nach der zweimaligen Kurierung mit Fucose. Durch die Fucose im Medium wird der Fucose-induzierbare Promotor P_{fcsk} aktiv und das *cre*-Gen wird exprimiert. Die Rekombinase bindet an den *lox*-Elementen (schwarze Boxen) und schneidet die dazwischen liegende DNA heraus. Die Promotorregion von *htrA* bleibt erhalten. Zusätzlich bilden die ersten sechs und die letzten acht Nukleotide von *htrA* zusammen mit dem *lox72* Element eine kleine Narbe im Genom von *S. pneumoniae*, die erhalten bleibt und als roter Strich dargestellt wird. Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben. Em^R : Erythromycin resistent, Em^S : Erythromycin sensitiv.

Um die Cheshire-Kassette für die Deletion von *htrA* verwenden zu können, musste zunächst ein entsprechendes Konstrukt für die Deletion erstellt werden. In einer ersten PCR mit den Primern *htrA_pcr1_f* und *htrA_pcr1_r* (Tab. 2.9) wurde der upstream Bereich von *htrA* mit den Genen *comC* und *spr2044* für die spätere homologe Rekombination amplifiziert. Dabei fügte der Primer *htrA_pcr1_r* eine Restriktionsschnittstelle für *MluI* an die amplifizierte DNA an. In einer zweiten PCR wurde der downstream Bereich von *htrA* mit dem Gen *parB* für die spätere homologe Rekombination

amplifiziert. Dafür wurden die Primer htrA_pcr3_f und htrA_pcr3_r (Tab. 2.9) verwendet. Durch den Primer htrA_pcr3_f wurde dabei eine *NcoI* Restriktionsschnittstelle angefügt. Chromosomale DNA aus *S. pneumoniae* R6 wurde in beiden Fällen als Template eingesetzt. In einer dritten PCR wurden die Primer Che_Mlu und Cre_Nco (Tab. 2.9) verwendet, die an das Amplifikat eine *MluI* bzw *NcoI* Schnittstelle anfügten. Als Template diente dabei ein PCR-Produkt, welches die Cheshire-Kassette beinhaltete und das freundlicherweise von Prof. Dr. Donald A. Morrison (Laboratory for Molecular Biology, Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago) zur Verfügung gestellt wurde.

Nach erfolgter PCR wurde die Größe der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das PCR-Produkt der ersten PCR lieferte dabei eine Größe von 1129 bp und das aus der dritten PCR eine von 959 bp. Bei der Amplifikation der Cheshire-Kassette traten Nebenbanden auf. Deshalb wurde die Bande mit der richtigen Größe (2496 bp) präparativ aus dem Agarosegel aufgereinigt (Kap. 2.7.1.5). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten (Kap. 2.7.2.1). Nach erfolgter Aufreinigung wurden alle drei PCR-Produkte in eine Ligation eingesetzt (Kap. 2.7.2.2). Der Ligationsansatz wurden in frische kompetente Zellen der *S. pneumoniae* Stämme transformiert (Kap. 2.6.6.1). Selektioniert wurde bei der Transformation mit 0,1 µg/ml Erythromycin. Erhaltene Transformanten wurden auf D-Blutagarplatten mit Selektionsantibiotikum überstrichen. Anschließend wurde eine Fucose-Kurierung der Transformanten durchgeführt. Dabei wurden pro erstellten *S. pneumoniae* Stamm drei Transformanten zweimal mit Fucose kuriert. Die Transformanten wurden hierfür von der Blutagarplatte mit 0,1 µg/ml Erytromycin abgeimpft und steril in 2 ml auf 37 °C vorgewärmtes THY-Medium (Kap. 2.4.2) überführt. Die Kulturen wurden bei 37 °C im Wasserbad bis zum Erreichen einer sichtbaren Trübung inkubiert. Je ml einer trüben Kultur wurde für die erste Kurierung mit 3 ml vorgewärmten THY-Medium mit Fucose (Endkonzentration: 0,5 %) gemischt und bis zu einer OD von 0,65 wachsen gelassen. Die Kulturen wurden konserviert und jeweils 100 µl einer Kultur wurde in eine Verdünnungsreihe in NaCl (0,9 %) eingesetzt. Die Verdünnungen wurden auf D-Blutagarplatten mit und ohne Erytromycin ausplattiert. In einer zweiten Kurierung mit Fucose wurde jeweils 1 ml der trüben Kulturen der ersten Kurierung erneut in 4 ml THY-Medium mit Fucose (Endkonzentration: 0,5 %) überführt und bis zu einer OD von 1 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Kulturen konserviert und wie bereits beschrieben in eine Verdünnungsreihe eingesetzt und auf D-Blutagarplatten mit und ohne Erytromycin ausplattiert. Mit diesem Experiment wurde der Verlust der Resistenz gegen Erytromycin nach Fucosezugabe überprüft.

Weitergearbeitet wurde mit den Transformanten, die nach der 2. Kurierung mit Fucose kein Wachstum auf den D-Blutagarplatten mit 0,1 µg/ml Erythromycin zeigten. Von diesen Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert (Kap. 2.7.1.1), die daraufhin als Template in eine Kontroll PCR mit der iProof DNA-Polymerase (Kap. 2.7.2.3) und den Primern htrA_kontrolle_f und htrA_kontrolle_r

(Tab. 2.9) eingesetzt wurde. Bei erfolgreicher Excision der Cheshire-Kassette lieferten die Transformanten dabei ein 2216 bp großes PCR-Produkt. Als Negativkontrolle wurde die chromosomale DNA einer resistenten Transformante eingesetzt. Diese lieferte bei der Kontroll-PCR ein PCR-Produkt mit der Größe von 4649 bp. Die PCR-Produkte der richtigen Transformanten wurden aufgereinigt und mittels Sequenzierung (Kap. 2.7.2.4) untersucht. Damit wurde zusätzlich die richtige homologe Rekombination in das Genom und die Abwesenheit von Punktmutationen bestätigt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die Stämme KPKL1, KPKL3 und KPKL4 (Tab. 2.2) erstellt, die für weitere Experimente zur Verfügung standen.

2.7.3.3 Herstellung von *htrA*-Komplementationsderivate

Ausgehend von *htrA*-Deletionsstämmen sollten unterschiedliche *htrA*-Komplementationsstämmen erstellt werden. Hierfür wurden Komplementationsstämmen von *htrA* erzeugt, in denen eine ektopische Kopie von *htrA* mit dem nativen Promotor von *htrA* in das Genom von *S. pneumoniae* eingefügt wurde. Zusätzlich wurden weitere Komplementationsstämmen konstruiert, in denen das *htrA* Gen zum einen, unter die Kontrolle eines starken *vegM*-Promotors, und zum anderen unter die Kontrolle eines sehr starken *16S rRNA*-Promotor gestellt wurde. Auf diese Weise wurde die Expression von *htrA* in verschiedenen genetischen Hintergründen stufenweise erhöht und die daraus folgenden Auswirkungen auf die PBP2x-Menge in den Stämmen untersucht. In Abb. 2.4 ist die genetische Organisation der konstruierten *htrA*-Komplementationsstämmen nach Integration in das Genom von *S. pneumoniae* dargestellt.

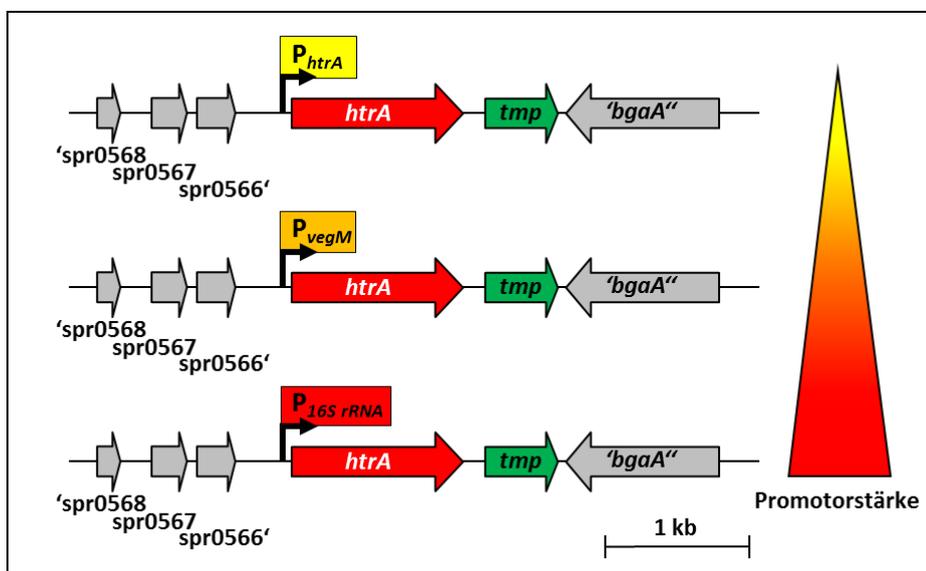


Abb. 2.4: Genetische Organisation der *htrA*-Komplementationsstämmen nach Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6. Dargestellt sind die jeweiligen genetischen Organisationen der *htrA*-Komplementationsstämmen nach erfolgter Integration. Die stufenweise steigende Promotorstärke wird durch die Änderung der Farbe des Promotors und durch das breiter werdende Dreieck (rechts) dargestellt. Die einzelnen Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet. Promotorstrukturen (Γ) sind markiert. Die Integration in das *S. pneumoniae* Genom erfolgt zuvor durch homologe Rekombination über die Gene *spr0566*, *spr0567*, *spr0568* und *bgaA* (grau dargestellt). *tmp*: Trimethoprim (grüner Pfeil). Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

Das Plasmid pSW1 (Schnorpfel, 2010) wurde als Integrationsplasmid für die Konstruktion der Komplementationsstämme verwendet, da es in das *S. pneumoniae* Genom über homologe Rekombination durch die Gene spr0566', spr0567, 'spr0568 und 'bgaA'' integriert und somit an einer anderen Stelle integriert, als das Promotor Probe Plasmid pPP2. Deshalb war es bei experimentellem Bedarf möglich mit den konstruierten Stämmen β -Galaktosidaseassays durchzuführen und die Promotorstärken zu messen. In Abb. 2.5 sind die Integrationsstellen der beiden Plasmide im Genom von *S. pneumoniae* dargestellt.

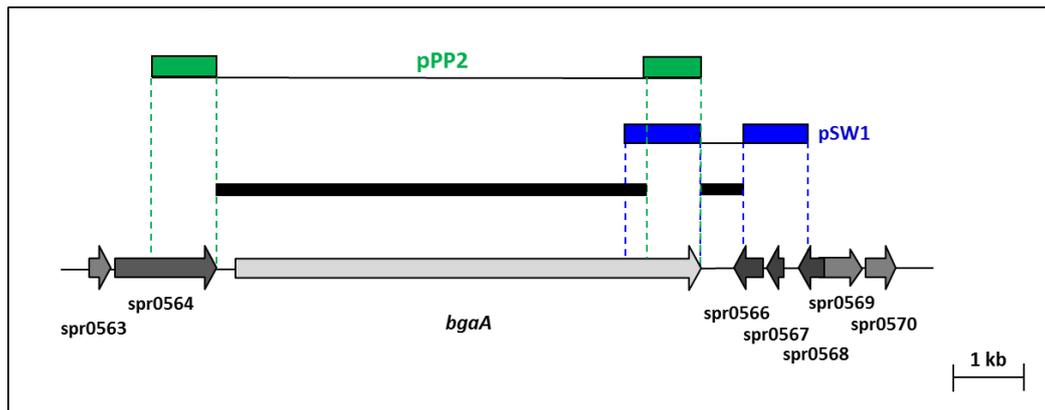


Abb. 2.5: Integrationsstellen der Plasmide pPP2 und pSW1 im Genom von *S. pneumoniae* R6. Genetische Organisation der Region zwischen spr0563 und spr0570 im Genom von *S. pneumoniae* R6 vor der Integration von pPP2 und pSW1. Die einzelnen Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet. *bgaA*: endogene β -Galaktosidase, spr0563 - spr0570: Funktion ist unbekannt. Die Integration von pPP2 erfolgt durch homologe Rekombination über die Gene 'spr0564 und 'bgaA' (grün gestrichelte Linien und grüne Balken). Die Integration von pSW1 erfolgt über die Gene spr0566', spr0567, 'spr0568 und 'bgaA'' (blau gestrichelte Linien und blaue Balken). Die schwarzen Balken stellen die genetischen Bereiche dar, der bei der jeweiligen Integration ersetzt werden. Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

In das Integrationsplasmid pSW1 wurde für diese Komplementationsstudien das *htrA* Gen mit seinem nativem Promotor und zusätzlich 163 bp vor und 53 bp nach dem kodierenden Bereich des Gens kloniert und auf diese Weise das Plasmid pKP01 erstellt.

In Abb. 2.6 ist die genetische Karte des pKP01 Plasmids dargestellt. Das Plasmid repliziert in *E. coli* und lässt sich aufgrund des *bla* Gens, das Ampicillin Resistenz vermittelt, selektionieren. Das Gen *tmp* vermittelt dabei in *S. pneumoniae* Resistenz gegen Trimethoprim.

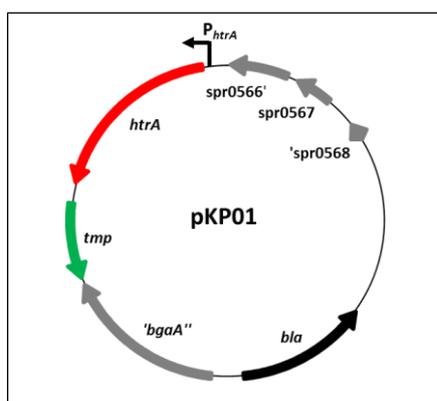


Abb. 2.6: Genetische Organisation des Plasmids pKP01. Genkarte des Plasmids pKP01: Die einzelnen Gene des Plasmids sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Integration in das *S. pneumoniae* Genom erfolgt durch homologe Rekombination über die Gene spr0566', spr0567, 'spr0568 und 'bgaA'' (grau dargestellt). *tmp*: Trimethoprim-resistenz (grüner Pfeil), *bla*: β -Laktamase (Ampicillin-Resistenz, schwarzer Pfeil), spr0566- spr0568: Funktion unbekannt, 'bgaA''': Teil des Gens der endogenen β -Galaktosidase. Das Plasmid besitzt das Gen *htrA* (roter Pfeil) mit seinem nativem Promotor (\blacktriangleright).

Die Herstellung des Plasmids pKP01 erwies sich als schwierig, deshalb wurde eine Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) durchgeführt. Hierfür wurde *htrA* mit seiner Promotorregion aus *S. pneumoniae* R6 in einer PCR mit den Primern *htrA_kompl-NheI* und *htrA_normal_f1* (Tab. 2.13) und der RedGoldstarTM DNA-Polymerase amplifiziert und anschließend in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) gebracht. Dieser Vektor besitzt T-Überhänge an den 3'-Enden und ermöglicht somit eine TA-Klonierung. Die RedGoldstarTM DNA-Polymerase besitzt zudem eine Extendase Aktivität, wodurch an den 3'Enden der PCR-Produkte meistens A-Überhänge entstehen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurden Kolonie-PCRs mit den Primern pUK-M13 forward24 und pUK-M13 reverse22 (Tab. 2.10) durchgeführt und die PCR Produkte mit den gleichen Primern sequenziert. Das auf diese Art erstellte pGEM-T-Easy Derivat pKP1 wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NheI* geschnitten, um das klonierte Insert wieder heraus zuschneiden. Vorteil bei dieser Methode ist, dass bei erfolgreicher Restriktion mit Sicherheit beide Schnittstellen vorhanden sein müssen. Im Anschluss wurde das Plasmid pSW1 ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NheI* verdaut (Kap. 2.7.2.1) und mit dem geschnittenen PCR-Produkt ligiert. Nach erfolgter Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen wurden die Transformanten mittels Kolonie-PCR mit den Primern pBP4_f und pBP5_r (Tab. 2.11) überprüft und anschließend sequenziert (Kap. 2.7.2.4). Nach Erhalt des positiven Sequenzierergebnis wurde das konstruierte Plasmid pKP01 in mehrere *S. pneumoniae* Stämme transformiert; selektioniert wurde dabei mit Trimethoprim (15 μ g/ml). Erhaltene Transformanten wurden konserviert und mittels Kultur-PCR mit den Primern IntFragA_up und IntFragB_down (Tab. 2.11) überprüft. Bei erfolgreicher Integration des Plasmids pKP01 in das *S. pneumoniae* Genom wurde dabei ein PCR-Produkt mit einer Größe von 4663 bp amplifiziert. Bei nicht erfolgter Integration lieferte die Kontroll-PCR ein 3245 bp großes Fragment. PCR-Produkte mit der richtigen Größe wurden sequenziert, um die korrekte Rekombination in das Genom und die Abwesenheit von Punktmutationen zu bestätigen. Auf diese Weise wurden die Komplementationsstämme KPKL11, KPKL31 und KPKL41 (Tab. 2.2) erstellt.

Für die Herstellung von Komplementationsderivaten von *htrA* mit dem starken Promotor *vegM* wurde zunächst eine PCR mit den Primern *htrA_kompl-NheI* und *htrA_vegM_f1* (Tab. 2.13) und der iProof DNA-Polymerase durchgeführt. Als Template diente dabei chromosomale DNA von dem Stamm *S. pneumoniae* R6 PP2*vegM* (RKL45; Halfmann *et al.*, 2007b), der bereits eine *vegM-htrA* Fusion beinhaltet. Durch die verwendeten Primer wurden die Schnittstellen für *BamHI* und *NheI* angefügt. Nach der Aufreinigung wurde das PCR-Produkt mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten (Kap. 2.7.2.1) und anschließend mit dem ebenfalls verdauten pSW1 Plasmid ligiert (Kap. 2.7.2.2). Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert, jedoch ohne Erfolg. Deshalb wurde der Ligationsansatz direkt in kompetente Zellen der *S. pneumoniae* Stämme transformiert. Bei der Transformation und der anschließenden Überprüfung der Stämme mittels Kultur-PCR wurde wie be-

reits beschrieben verfahren. Bei einer erfolgten Integration lieferte die Kontroll-PCR in diesem Fall ein 4748 bp großes Fragment, das sequenziert wurde. Mit dieser Vorgehensweise wurden die Komplementationsstämme KPKL12, KPKL321-KPKL325, KPKL421-KPKL425 (Tab. 2.2) erstellt.

Für die Herstellung von Komplementationsderivaten von *htrA* mit dem sehr starken *16S rRNA*-Promotor musste zuerst ein Fusionskonstrukt aus dem *16S rRNA*-Promotor mit dem Gen *htrA* erstellt werden. Dabei wurde die Methode der Überlappenden PCR (Kap. 2.7.2.3) verwendet. In einer ersten PCR wurde das Gen *htrA* ohne Promotor (ab dem Transkriptionstat +1) mit den Primern *htrA_kompl-NheI* und *htrA_16sRNA-P-1* (Tab. 2.13) amplifiziert. Dabei fügte der Primer *htrA_kompl-NheI* eine *NheI* Restriktionsschnittstelle an. Der Primer *htrA_16sRNA-P-1* fügte stattdessen einen Überhang an, der komplementär zur Sequenz des *16S rRNA*-Promotor war. In einer zweiten PCR wurde der *16S rRNA*-Promotor amplifiziert. Dabei wurden die Primer *16sRNA_ppf_BamHI* und *htrA-16sRNA-P_2* verwendet. Der eine Primer fügte eine *BamHI* Restriktionsschnittstelle an, während der andere Primer einen komplementären Überhang produzierte. Zur Herstellung dieser PCRs wurde die iProof DNA-Polymerase und chromosomale DNA aus *S. pneumoniae* R6 als Template verwendet. Das erste Produkt lieferte dabei eine Größe von 1293 bp und das zweite eine von 127 bp. Beide PCR-Produkte wurden nach der Aufreinigung in eine Überlappende PCR (Kap. 2.7.2.3) mit den Primern *16sRNA_ppf_BamHI* und *htrA_kompl-NheI* eingesetzt, welche ein Produkt der Größe 1364 bp lieferte. Das Produkt der Überlappenden PCR wurde aus dem Gel eluiert (Kap. 2.7.1.5) und mit den beiden Restriktionsenzymen *BamHI* und *NheI* geschnitten. Nach einer Aufreinigung wurde das geschnittene PCR-Produkt mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor pSW1 ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden erneut auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum überpickt. Dabei wurde beobachtet, dass die Transformanten zunächst durchsichtig wurden und anschließend starben.

Daher wurde der Ligationsansatz direkt in kompetente Zellen des *S. pneumoniae* Stamms KPKL1 unter Selektion mit 15 μ g/ml Trimethoprim transformiert. Erhaltene Transformanten wurden mittels Kultur-PCR wie bereits beschrieben überprüft und lieferten bei korrekter Integration in das Genom ein 4850 bp großes PCR-Produkt, das sequenziert wurde. Die Komplementationsstämme KPKL131-KPKL135 (Tab. 2.2) wurden so erstellt.

2.7.3.4 Herstellung von HtrA_{S234A}-Derivaten mittels gerichteter Mutagenese

Die Serinprotease HtrA besitzt sowohl Chaperon-, als auch Proteaseaktivität. Für durchgeführte Experimente innerhalb dieser Arbeit war es nötig *htrA*-Deletionenstämme mit einer Protease inaktive Form von *htrA* zu komplementieren.

Hierfür wurde die Methode der gerichteten Mutagenese angewandt. Das Ausschalten der proteolytischen Aktivität wurde durch den Austausch des Serins an der Position 234 der katalytischen Triade zu einem Alanin realisiert. Dabei wurde das Serin Codon TCT zu dem Alanin Codon GCC umgewandelt. Die Codon Optimierung fand dabei in Anlehnung an die Prokaryotes Codon Usage Database: <http://exon.gatech.edu/GeneMark/metagenome/CodonUsageDatabase/> statt.

Die Abb. 2.7 zeigt schematisch die verwendete Strategie zur Herstellung von HtrA_{S234A}-Derivaten.

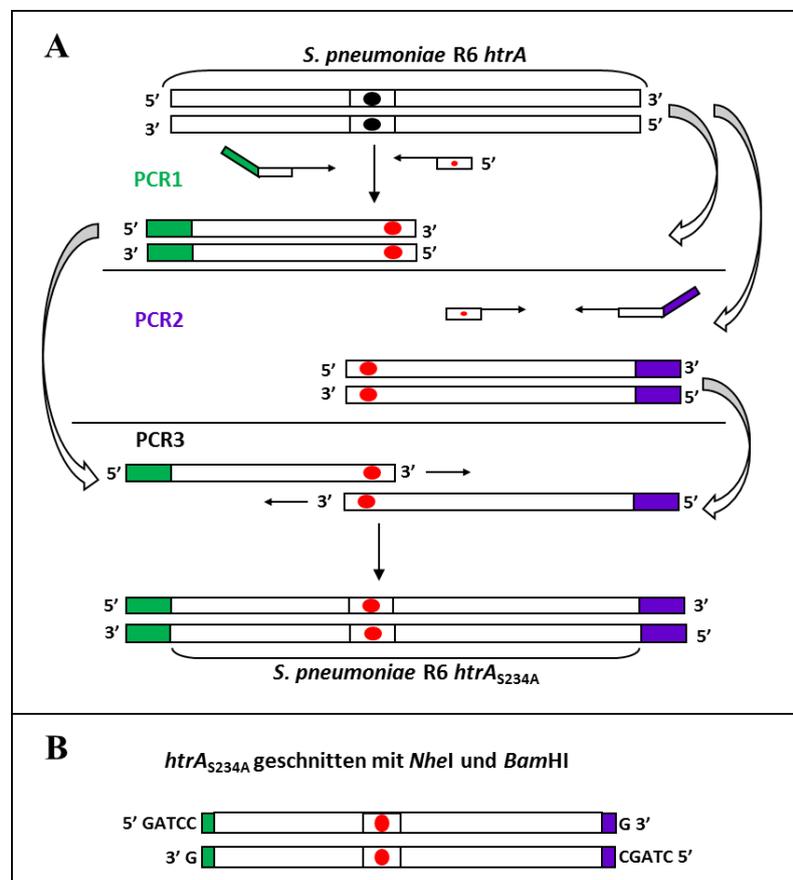


Abb. 2.7: Strategie zur Herstellung von HtrA_{S234A}-Derivaten. **A:** Gerichtete Mutagenese mittels überlappender PCR. In zwei PCRs mit Mutageneseprimern werden zwei Fragmente des *htrA*_{S234A}-Gens erzeugt, wobei die erstellten PCR-Produkte im Bereich der eingeführten Mutation überlappen. Die Lage der Primer *htrA*_kompl-*NheI* und *htrA*_normal_*fI* und ihre Orientierung werden durch Pfeile angezeigt. Angefügte Restriktionsschnittstellen sind durch farbige Kästchen symbolisiert (grün: *BamHI*, lila *NheI*). Die Mutationsstelle wird durch einen Punkt markiert (schwarz: ursprünglich, rot: bereits mutiert). In einer dritten Überlappenden PCR werden beide PCR-Produkte als Template zugegeben. Es entsteht ein PCR-Produkt, das im Vergleich zur Template-DNA zwei Mutationen aufweist. **B:** Restriktion mit *NheI* und *BamHI*. Dargestellt ist das PCR-Produkt nach erfolgter Restriktion.

Bei der experimentellen Durchführung der gerichteten Mutagenese wurden zunächst zwei PCR-Produkte mit Hilfe der iProof DNA-Polymerase generiert. Beide PCR-Produkte beinhalteten die zwei Punktmutationen und waren im Bereich der eingeführten Mutation komplementär zueinander (Abb. 2.7). Chromosomale DNA aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 diente beiden PCRs als Template. Die erste PCR mit den Primern htrA_normal_f1 und htrA_Ala_f (Tab. 2.14) lieferte dabei ein Produkt der Größe von 889 bp, das sowohl die Promotorregion von *htrA*, als auch die CiaR Bindestelle beinhaltete. Der Primer htrA_Ala_f war ein Mutageneseprimer, der die Mutationen enthielt und den homologen Überhang an das PCR-Produkt anfügte. Mit Hilfe des Primers htrA_normal_f1 wurde zusätzlich eine Schnittstelle für *Bam*HI angehängt.

In der zweiten PCR wurden die Primer htrA_kompl-NheI und htrA_Ala_r (Tab. 2.14) verwendet, wobei der Primer htrA_kompl-NheI die Restriktionsschnittstelle für *Nhe*I anfügte und htrA_Ala_r die Mutationen enthielt und einen homologen Überhang produzierte. Die zweite PCR lieferte ein Fragment der Größe von 563 bp. Beide PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel eluiert (Kap. 2.7.1.5) und anschließend in eine dritte Überlappende PCR (Kap. 2.7.2.3) als Template eingesetzt. Für diese PCR wurden die Primer htrA_kompl-NheI und htrA_normal_f1 verwendet. Dabei entstand ein 1417 bp großes PCR-Produkt. Dieses wurde nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nhe*I geschnitten und mit dem ebenfalls mit beiden Enzymen geschnittenen Vektor pSW1 ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente *S. pneumoniae* Zellen transformiert. Erhaltene Transformanten wurden mittels Kultur-PCR (Kap. 2.7.2.3), wie bereits für die zuvor beschriebenen *htrA*-Komplementationsstämme beschrieben, überprüft. Die Stämme *S. pneumoniae* KPKL14, KPKL51 und KPKL61 (Tab. 2.2) wurden mit der beschriebenen Methode der gerichteten Mutagenese erstellt.

2.7.3.5 Herstellung der Stämme *S. pneumoniae* R6 2xC405 *ciaHC305* und R6 2xC606 *ciaHC306* mittels Janus-Kassette

Die resistenten Laborstämme *S. pneumoniae* C405 und C606 besitzen neben bereits beschriebenen AS-Austauschen in PBP2x und CiaH weitere teilweise unbekannte Veränderungen. Daher sollten die *ciaH*-Allele *ciaH305* und *ciaH306* aus C405 und C606 in die Stämme *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 bzw. R6_{pbp2xC606}-T6 (Tab. 2.1), die bereits die jeweiligen Veränderungen in PBP2x besitzen, gebracht werden. Anschließend wurde eine Auswirkung der Kombinationen aus veränderten CiaH und verändertem PBP2x aus C405 und C606 auf die PBP2x-Menge im definierten genetischen Hintergrund von R6 untersucht.

Um diese *ciaH*-Allele in diesen genetischen Hintergrund zu bringen, wurde die Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) verwendet. Die Janus-Kassette besteht aus dem Gen *aphIII*, das für die Resistenz gegen Kanamycin verantwortlich ist. Des Weiteren besitzt sie die dominante Form des Gens *rpsL*, welche Streptomycinsensitivität verleiht. Diese elegante Konstruktion ermöglicht beim Einbringen und auch beim Entfernen der Kassette eine Selektion, wobei der Austausch der Gene durch negative Selektion erfolgt. In Abb. 2.8 ist die Strategie zur Einführung des *ciaH306*-Allels mit Hilfe der Janus-Kassette mit den einzelnen Schritten schematisch dargestellt.

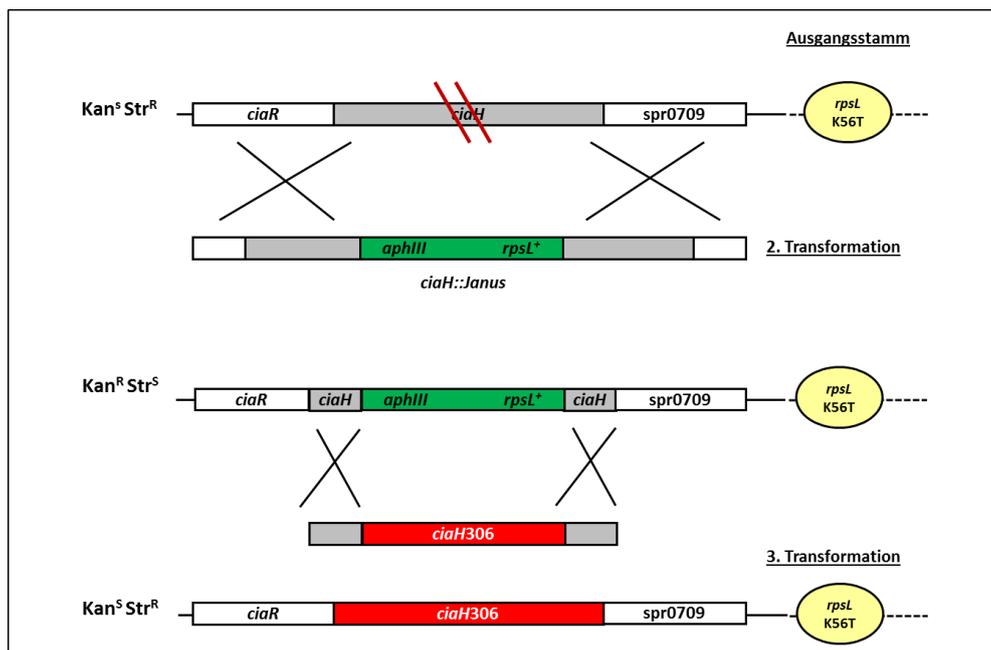


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Strategie zur Einführung des *ciaH306*-Allels mit Hilfe der Janus-Kassette. Das dargestellte Schema verdeutlicht die einzelnen Schritte zur Einführung des *ciaH306*-Allels in das Genom. In einer ersten Transformation wurde die Punktmutation K56T in *rpsL* in das Genom eingebracht. Selektioniert wurde mit Streptomycin. Dieser Stamm war Streptomycin-resistent und diente als Ausgangsstamm für die folgenden Transformationen. In der zweiten Transformation wurde die Janus-Kassette anstelle von *ciaH* in das Genom integriert. Selektioniert wurde mit Kanamycin. Graue Balken symbolisieren die Bereiche, die für die homologe Rekombination benötigt wurden. Nach erfolgter Transformation waren diese Stämme resistent gegenüber Kanamycin und sensitiv gegen Streptomycin. In einer dritten Transformation wurde das *ciaH306*-Allel mit seinen flankierenden Regionen unter Selektion mit Streptomycin anstelle der Janus-Kassette integriert. Die erhaltenen Transformanten waren dabei sensitiv gegen Kanamycin, jedoch Streptomycin-resistent.

Eine Voraussetzung für die Verwendung der Janus-Kassette ist die Streptomycin-Resistenz der Ausgangsstämme. Wie aus Abb. 2.8 zu entnehmen ist, kommt der Austausch von Genen mittel Janus-Kassette in ein paar Schritten zu Stande. In einer Transformation (Abb. 2.8: 2. Transformation) unter Selektion auf Kanamycin integriert sich die Janus-Kassette anstelle von *ciaH* durch homologe Rekombination in das Genom von *S. pneumoniae*. Der Stamm ist danach Kanamycin-resistent und aufgrund des dominanten *rpsL*-Allels der Janus-Kassette auch sensitiv gegen Streptomycin. Im darauf folgenden Schritt (Abb. 2.8: 3. Transformation) wird das *ciaH306*-Allel mit seinen flankierenden Regionen unter Selektion mit Streptomycin anstelle der Janus-Kassette integriert. Die erhaltenen Transformanten sind anschließend sensitiv gegen Kanamycin, jedoch Streptomycin-resistent.

In der ersten Transformation wurde der erforderliche Streptomycinresistenz-Phänotyp hergestellt (Abb. 2.8). Dafür wurde mit Hilfe der Primer *rpsL_f* und *rpsL_r* (Tab. 2.15) aus dem *S. pneumoniae* AmiA9 Stamm die Punktmutation K56T in *rpsL*, die Streptomycin-resistenz vermittelt, amplifiziert. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 592 bp und wurde in den zu untersuchenden Stamm transformiert. Auf diese Weise entstand der Stamm *S. pneumoniae* KPKL10 (Tab. 2.2).

Im weiteren Schritt wurde das Gen *ciaH* mit Hilfe der Janus-Kassette ausgetauscht. Die Janus-Kassette wurde in einer Kultur-PCR mit den Primern *CiaHup_f* und *CiaHdown_r* aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH::janus* (Schmitt; 2005, Tab. 2.1) amplifiziert. Nach dem Aufreinigen wurde das 2946 bp große PCR-Produkt in kompetente Zellen des Stamms *S. pneumoniae* KPKL10 transformiert. Dabei wurde mit 200 µg/ml Kanamycin selektioniert. Zur Kontrolle wurden die Transformanten sowohl auf D-Blutagarplatten mit Kanamycin (200 µg/ml), als auch auf Platten mit Streptomycin (200 µg/ml) ausgestrichen. Durch das dominante *rpsL*-Allel, das sich auf der Janus-Kassette befindet, waren die richtigen Transformanten nicht nur resistent gegen Kanamycin, sondern auch sensitiv gegen Streptomycin. Dies traf auf den erstellten *S. pneumoniae* Stamm KPKL101 (Tab. 2.2) zu. In einem weiteren Schritt wurde die Janus-Kassette aus dem Genom dieses Stamms entfernt und durch das gewünschte *ciaH306*-Allel ersetzt. Dafür wurde anhand einer Kultur-PCR mit den Primern *CiaHup_f* und *CiaHdown_r* (Tab. 2.15) ein 2946 bp großes PCR-Produkt aus dem Stamm *S. pneumoniae* C606 (Tab. 2.1) erstellt. Nach der Aufreinigung folgte eine Transformation in den Stamm *S. pneumoniae* Stamm KPKL101 (Tab. 2.2), wobei mit 200 µg/ml Streptomycin selektioniert wurde. Die Transformanten wurden sowohl auf D-Blutagarplatten mit Kanamycin, als auch auf Streptomycin überstrichen. Transformanten bei denen die Janus-Kassette erfolgreich aus dem Genom entfernt worden war, waren sensitiv gegen Kanamycin und Streptomycin-resistent. Zusätzlich wurden die erhaltenen Transformanten mittels Kultur-PCR mit den Primern *CiaHup_ff* und *CiaH_down_rr* (Tab. 2.15) überprüft. Richtige Transformanten lieferten dabei ein 2918 bp großes PCR-Produkt. Bei Stämmen, die noch immer die Janus-Kassette beinhalten, war das PCR-Produkt 3059 bp groß. Eine zusätzliche Überprüfung erfolgte anhand einer Sequenzierung. Die Stämme *S. pneumoniae* KPKL1011, KPKL1012 und KPKL1013 wurden mit der bereits beschriebenen Strategie erstellt.

Im Rahmen eines Forschungspraktikums (Heß, 2012) wurde der Stamm *S. pneumoniae* KPKL2011 erstellt und das *ciaH305*-Allel nach der gleichen Methode in das Genom eingebracht.

2.7.3.6 Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte

Die Lokalisation von GFP-Fusionskonstrukten kann anhand von Fluoreszenzmikroskopie des Fusionsproteins in lebenden Zellen analysiert werden. In dieser Arbeit wurden Stämme erstellt, die ein GFP-PBP2_{C405}-Fusionsprotein besitzen, das die AS-Austausche T526S und L403F in PBP2x beinhaltet. Anschließend wurden die Lokalisationsprofile des Fusionsproteins GFP-PBP2_{C405} mittels Fluoreszenzmikroskopie in unterschiedlichen genetischen Hintergründen untersucht.

Zur Herstellung von N-terminalen GFP-PBP2x-Fusionskonstrukten stand der Vektor pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009) zu Verfügung. Dieser Vektor besitzt einen zinkinduzierbaren Promotor (*P_{czcD}*), mit dessen Hilfe die Expression der GFP-Fusionskonstrukte gesteuert werden kann. Ferner können Gene über *SpeI* und *NotI*-Schnittstellen an das 3'-Ende von *gfp* kloniert werden. Zusätzlich befindet sich am 3'-Ende von *gfp* eine Sequenz, die für einen Linker kodiert. Diese Linkerregion realisiert die flexible Trennung zwischen der GFP-Domäne und dem Zielprotein, das daran fusioniert wird (Eberhardt *et al.*, 2009). Die Integration des Plasmids in das Genom von *S. pneumoniae* erfolgt durch homologe Rekombination über die Gene *spr0564* und *'bgaA*, wobei mit Tetracyclin (2,5 µg/ml) selektioniert wird. In Abb. 2.9 ist genetische Organisation des pF12 Plasmids und dessen Integration in das Genom von *S. pneumoniae* veranschaulicht. Um das Plasmid pFP12 zu erhalten, wurde das mutierte *pbp2x* Gen aus C405 in den Vektor pJWV25 kloniert.

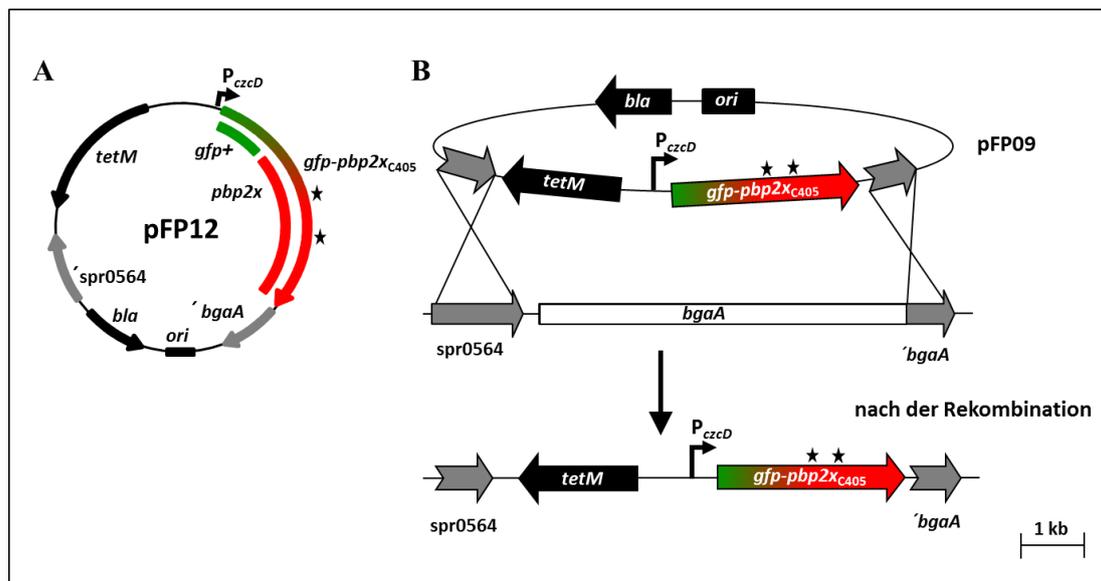


Abb. 2.9: Genetische Organisation des pFP12 Plasmids und dessen Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6. **A:** Detaillierte Darstellung der genetischen Organisation des pFP12 Plasmids. Die einzelnen Gene und ihre Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. Das Plasmid ist in *E. coli* replizierbar, wobei das *bla* Gen Ampicillin-Resistenz verleiht. Das Gen *tetM* verleiht in *S. pneumoniae* Tetracyclinresistenz. Beide Resistenzgene sind als schwarze Pfeile dargestellt. Der zinkinduzierbare Promotor P_{czcD} \blacktriangleright steuert die Expression des Fusionsgens *gfp-pbp2x*_{C405}. Der grün dargestellte Abschnitt, symbolisiert *gfp* und der rot markierte Bereich das Gen *pbp2x*_{C405}. Die zwei schwarzen Sterne symbolisieren Punktmutationen in *pbp2x*, die zu den AS-Austauschen T526S und L403S führen. Die Integration des Plasmids erfolgt durch Doppel-Crossover über homologe Bereiche (grau). **B:** Integration von pFP12 in das *S. pneumoniae* Genom R6. Gezeigt ist das Plasmid pFP12, der *S. pneumoniae* spr0567/*bgaA* Locus vor und nach der Integration des Plasmids. Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

Dafür wurde *pbp2x* zunächst mit der iProof DNA-Polymerase in einer PCR mit den Primern *pbp2x_gfp_r* und *pbp2x_gfp_f* (Tab. 16) amplifiziert. Als Template wurde chromosomale DNA des Stamms *S. pneumoniae* C405 (Tab. 2.1) eingesetzt. Durch die verwendeten Primer werden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SphI* und *NotI* angefügt. Die PCR lieferte ein 2279 bp großes Fragment. Im nächsten Schritt wurde sowohl das PCR-Produkt, als auch der Vektor pJWV25 mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten und aus dem Agarosegel eluiert. Es folgte eine Ligation und eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen (Tab. 2.3). Selektioniert wurde mit Ampicillin (100 mg/ml). Erhaltene Transformanten wurden in einer Kolonie-PCR mit den Primern pJWV25-screen F und pJWV25-screen R (Tab. 2.16) überprüft und lieferten bei erfolgreicher Transformation ein 2670 bp großes PCR-Produkt. Das Plasmid pFP12 wurde in großen Mengen aus *E. coli* DH5 α isoliert, durch Sequenzierung überprüft und stand für weitere Experimente zur Verfügung.

Das pFP12 wurde für die Erstellung der Stämme *S. pneumoniae* KPCL7 und KPCL8 verwendet. Die Plasmid DNA wurde in kompetente Zellen der Stämme C405 und R6_{*pbp2x*C405}-T6 transformiert, wobei mit Tetracyclin (2,5 μ g/ml) selektioniert wurden. Anschließend wurde die korrekte Integration in das Genom von *S. pneumoniae* mit Hilfe von drei Kultur PCRs überprüft. In der 1. PCR wurden die Primer *bgaA-check-F* und *bgaA-check-R* benutzt, die bei richtigen Transformanten ein 8909 bp großes Fragment lieferten. Die Überprüfung der Integration des upstream Bereichs erfolgte mit den Primern *EII_fwd_Kontr* und *tetM_rev_Kontr* (Tab. 2.12). Bei erfolgter Integration erhielt man dabei ein PCR-Produkt der Größe von 1791 bp. Zur Überprüfung des downstream Bereichs dienten die Primer *bgaA-check-R* und *pbp2x_for_kontr* (Tab. 2.16), die nur bei korrekter Integration ein 1422 bp großes PCR-Produkt lieferten. Eine weitere Überprüfung der Stämme fand mittels Sequenzierung statt. Dafür wurde das 1. PCR-Produkt aufgereinigt und zur Sequenzanalyse weggeschickt.

2.7.3.7 Herstellung der *pbp2x*-Deletionskonstrukte

Um Depletionsexperimente durchführen zu können, war es nötig das native *pbp2x* der Stämme zuvor zu deletieren, um sicherzustellen, dass die untersuchte Wachstums- und Morphologiephänotypen ausschließlich auf die jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte zurückzuführen sind. Bei den Lokalisationsstudien in den GFP-Stämmen war es ebenfalls nötig das native *pbp2x* zu deletieren, da die Stämme ansonsten bei ZnCl_2 Zugabe zwei funktionsfähige PBP2x-Proteine besaßen und dies sich wiederum auf die Lokalisationssignale auswirken könnte.

Zur Deletion des nativen *pbp2x* stand das Plasmid p2xKO (Stahlmann, 2010) zur Verfügung. Dieses Plasmid besitzt die Spectinomycin-Resistenzkassette *aad9*, die nach der Transformation des Plasmids über homologe Rekombination der flankierenden Gene *yllC*, *ftsL* und *mraY* in das Genom von R6 integriert und dabei das Gen *pbp2x* ersetzt. Die Abb. 2.10 zeigt die genetische Organisation des p2xKO Plasmids und die Integration des Gens *aad9* in das Genom von *S. pneumoniae* R6.

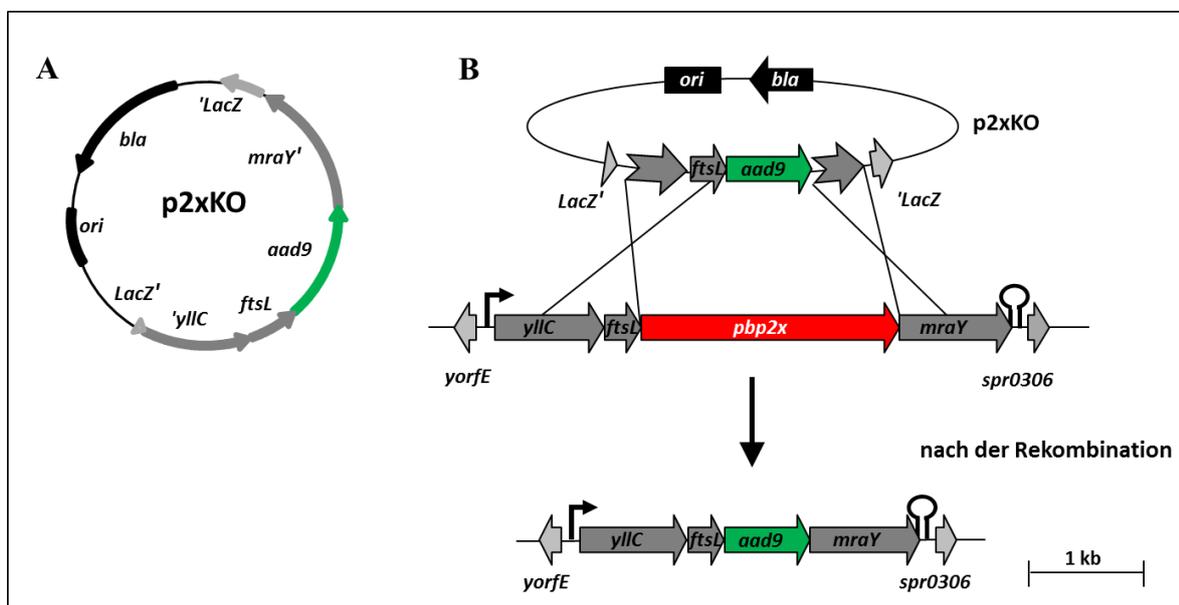


Abb. 2.10: Genetische Organisation des p2xKO Plasmids und Integration des Gens *aad9* in das Genom von *S. pneumoniae*. **A:** Detaillierte Darstellung der genetischen Organisation des p2xKO Plasmids, welches zur Deletion des nativen *pbp2x* im *S. pneumoniae* R6 Genom konstruiert wurde. Die einzelnen Gene und ihre Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. Das Plasmid repliziert in *E. coli*, wobei das *bla* Gen (schwarz) Ampicillinresistenz verleiht. Das Gen *aad9* (grüner Pfeil) verleiht in *S. pneumoniae* Spectinomycin-Resistenz. Die Integration des Plasmids erfolgt durch Doppel-Crossover über homologe Bereiche (dunkelgrau). **B:** Integration von p2xKO in das *S. pneumoniae* Genom. Gezeigt ist das Plasmid p2xKO, der *S. pneumoniae* *pbp2x* Locus vor und nach der Integration des Plasmids. Die Gene *yllC*, *ftsL*, *pbp2x* und *mraY* liegen in einem Operon; die Lage des Promotors \blacktriangleright und des Terminators U sind gezeigt. Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

Bei der experimentellen Durchführung wurde das p2xKO Plasmid in kompetente Zellen der Stämme KPKL7 und KPKL8 (Tab. 2.2) transformiert. Zur Selektion wurden $20 \mu\text{g/ml}$ Spectinomycin verwendet. Die Selektionsplatten und die Transformationsansätze beinhalteten zusätzlich ZnCl_2 (Endkonzentration $0,15 \text{ mM}$). Die Transformationsplatten wurden für zwei Tage bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Erhaltene Transformanten wurden erneut auf D-Blutagarplatten mit $20 \mu\text{g/ml}$ Spectinomycin

und 0,15 mM ZnCl₂ überstrichen. Anschließend wurden die Transformanten mit Hilfe von drei Kultur-PCRs auf die korrekte Integration des Plasmids p2xKO hin untersucht. In der ersten durchgeführten PCR wurden die Primer KO2xR6_kont-f und KO2xR6_kontr_r (Tab. 2.17) eingesetzt. Bei korrekter Integration lieferte diese PCR ein 3013 bp großes Fragment. Ein Kontrollansatz, der mit einer Kultur aus *S. pneumoniae* R6 angesetzt wurde, zeigte dagegen ein Produkt von 4507 bp. In der zweiten PCR wurden der Primer spec_raus2, der innerhalb der Spectinomycinkassette bindet und der Primer KO2xR6_kont-f (Tab. 2.17) verwendet. Richtige Transformanten zeigten bei dieser PCR ein 1348 bp großes Fragment, wohingegen bei der Kontroll-PCR mit einer R6 Kultur kein Produkt amplifiziert werden konnte. Bei der dritten PCR kamen die Primer spec_raus1 und KO2xR6_kontr_r (Tab. 2.17) zum Einsatz. Da auch hier ein Primer innerhalb der Resistenzkassette lag, lieferte die Kontroll-PCR mit R6 Kultur kein PCR-Produkt. Bei richtigen Transformanten konnte hingegen ein Produkt mit der Größe von 1215 bp amplifiziert werden. Die 3013 bp großen PCR-Produkte der Transformanten wurden mittels Sequenzierung überprüft.

2.8 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

2.8.1 Konstruktion des Plasmids pKP02

Zur Bestimmung der Promotoraktivität des *16S rRNA*-Promotors wurde das integrative Promotor Probe Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) verwendet. Dieses Plasmid besitzt ein promotorloses *lacZ*, als Reportergen, das die β -Galaktosidase kodiert. Um die Aktivität eines Promotors zu messen, wird dieser zunächst vor das *lacZ* kloniert, das hergestellte Plasmid wird in die kompetenten *S. pneumoniae* Zellen transformiert. Die Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6 findet anhand der Gene 'spr0564 und 'bgaA' über ein Doppel-Crossover statt. Das Plasmid pPP2 besitzt die Ribosomenbindestelle von dem Gen *htrA*, welche dem *lacZ*-Gen als Initiationssignal für die Translation dient und somit eine effiziente Translation in *S. pneumoniae* ermöglicht. Die Stärke des zu untersuchenden Promotors wird im Anschluss anhand β -Galaktosidaseaktivität ermittelt.

Zur Herstellung des Plasmids pKP02 (Tab. 2.4) wurde die Promotorregion des *16S rRNA*-Promotors mit Hilfe einer PCR mit der iProof DNA-Polymerase (Kap. 2.7.2.3) und den Oligonukleotiden 16S_ppf und 16S_ppr (Tab. 2.12) amplifiziert. Das Plasmid pPP2 und das amplifizierte PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sph*I geschnitten (Kap. 2.7.2.1) und nach dem Aufreinigen ligiert (Kap. 2.7.2.2). Es folgte eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen; wobei mit Ampicillin (100 μ g/ml) selektiert wurde. Die *lacZ*-Expression konnte auf LB-Platten mit X-Gal (AppliChem), einem chromogenen Substrat, nachgewiesen werden. Bei blauen Kolonien war die Klonierung erfolgreich, da sie eine funktionierende β -Galaktosidase besaßen. Diese Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.7.2.3) mit den Primern MCS_fwd_Kontr und 274-lac (Tab. 2.12) überprüft und das erhaltene PCR-Produkt sequenziert (Kap. 2.7.2.4).

In Abb. 2.11 ist die Genkarte des erstellten pPP2 Derivats, des Plasmids pKP02 dargestellt. Des Weiteren ist die genetische Organisation der *bgaA*-Region in *S. pneumoniae* nach der Integration von pKP02 zu sehen.

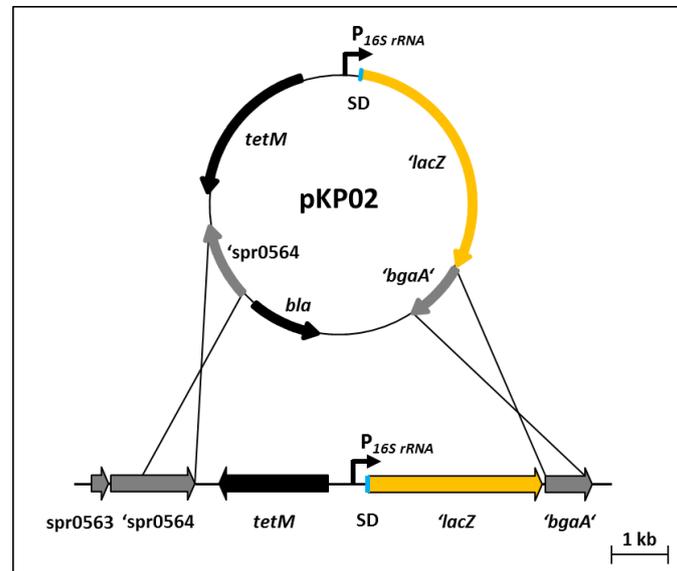


Abb. 2.11: Genetische Organisation des Plasmids pKP02 und dessen Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6. Oben: Genkarte des pKP02. **Unten:** Genetische Organisation der Region zwischen *spr0563* und *bgaA* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pKP02. Integration erfolgt durch homologe Rekombination über die Gene *'spr0564'* und *'bgaA'*. Die einzelnen Gene auf dem Plasmid und dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet. *tetM*: Tetracyclin-Resistenz, *bla*: β -Laktamase (Ampicillin-Resistenz), *'lacZ'*: β -Galaktosidase, *bga*: endogene β -Galaktosidase. Die Ribosomenbindestelle von *htrA* (Shine-Dalgarno-Sequenz, SD) ist hellblau dargestellt. Die Lage des *16S rRNA*-Promotors \blacktriangleright ist markiert. Der Maßstab ist in Kilobasenpaaren angegeben.

Das Plasmid pKP02 wurde nach Erhalt des positiven Sequenzierergebnis in kompetente *S. pneumoniae* R6 Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte dabei mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin. Zur Überprüfung der korrekten Integration in das *S. pneumoniae* Genom wurden die erhaltenen Transformanten mit Hilfe von drei Kultur-PCRs (Kap. 2.7.2.3) überprüft. In Tab. 2.12 sind die dafür verwendeten Primer aufgelistet. Bei korrekter Integration wurde bei der Kontroll-PCR mit den Primerpaaren EII_fwd_Kontr und tetM_rev_Kontr ein 1,7 kb großes Produkt amplifiziert. Die Kontroll-PCR mit den Primern MCS_fwd_kontr und bgaA_rev_Kontr lieferten ein 4,5 kb großes Produkt. Bei der Kontroll-PCR mit dem Primerpaar MCS_fwd_kontr und 274_lac wurde ein 437 bp großes Fragment erzielt. Das 437 bp große PCR-Produkt wurde mittels Sequenzierung überprüft. Auf diese Weise entstand der Stamm *S. pneumoniae* R6 PP216S rRNA (KPKL2, Tab. 2.2).

2.8.2 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

Die durchgeführten β -Galaktosidaseassays basieren auf einer Methode nach Miller (Miller, 1972). Die β -Galaktosidase spaltet bei diesem Assay das farblose chromogene Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) in einer enzymatischen Reaktion in Galaktose und ein o-Nitrophenol (ONP) mit gelber Farbe. Da die Gelbfärbung und die Konzentration von Galaktosidase im Reaktionsansatz proportional zueinander sind, kann die Zunahme von ONP durch die Ermittlung der OD₄₂₀ photometrisch erfasst werden und dient somit als Maß für die Konzentration der Galaktosidase im Reaktionsansatz. Im Gegensatz zum Endpunktassay nach Miller wurde bei den hier durchgeführten β -Galaktosidaseassays der lineare Verlauf der Farbentwicklung über die Zeit mittels Photometer verfolgt. Zudem diente anstelle der optischen Dichte der Kultur, die bestimmte Gesamtmenge an Protein im Reaktionsansatz als Bezugsgröße für die Ermittlung der β -Galaktosidaseaktivität. Die Proteinmenge im Reaktionsansatz wurde anhand eines Bradfordassays (Bradford, 1976) bestimmt. Bei der Durchführung der β -Galaktosidaseassays diente der Stamm *S. pneumoniae* R6 PP2, der das leere Plasmid pPP2 (Tab. 2.1, Halfmann, 2008) beinhaltet, als negative Kontrolle. Die positiven Kontrollen bildete zum einen der Stamm *S. pneumoniae* R6 PP2vegM (RKL45; Tab. 2.1, Halfmann *et al.*, 2007b), der einen starken Promotor besitzt und zum anderen der Stamm *S. pneumoniae* R6 PP2htrA (RKL43; Tab. 2.1, Halfmann *et al.*, 2007b), der den mittelstarken Promotor von *htrA* beinhaltet. Parallel zu diesen Kontrollstämmen wurde die β -Galaktosidaseaktivität des erstellten Stamms *S. pneumoniae* R6 PP216S rRNA (KPKL2, Tab. 2.2) ermittelt. Hierfür wurden zunächst Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme in 6 ml C-Medium hergestellt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Kulturen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden pro Stamm 80 ml vorgewärmtes C-Medium so inokuliert, dass sich eine Zelldichte von N 2-5 einstellte. Die anschließende Inkubation fand in Schottflaschen bei 37 °C im Wasserbad statt. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Nephelometers (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems) gemessen. Für eine Messung wurden dabei 7 ml der wachsenden Kultur keimfrei entnommen und in ein Reagenzglas gefüllt. Da die Promotoraktivität bei diesem Experiment über das Wachstum verfolgt werden sollte, wurde den Kulturen beim Erreichen der Zelldichten von N 30, 60, 90, 120 und 150 N steril Proben entnommen. Eine weitere, letzte Probe wurde 30 min nach dem Erreichen der Nephelo von 150 entnommen. Das Probevolumen variierte dabei je nach Zelldichte der Kultur. Bei einer Zelldichte der Probe von N 90 wurden 2 ml der Kultur entnommen. Befand sich die Zelldichte über oder unter diesem Wert, wurde das entnommene Volumen entsprechend angepasst. Die entnommenen Proben wurden in einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) pelletiert und der Überstand komplett verworfen. Pro Pellet wurden 500 μ l Lysepuffer (Tab. 2.40) zugegeben und resuspendiert. Die Proben wurden daraufhin 5 min bis zur vollständigen Lyse im Wasserbad inkubiert und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Die Messungen der β -Galaktosidaseaktivität

fanden in einem speziellen Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) statt, welches über ein angeschlossenes Wasserbad beheizt wurde.

Für die Durchführung des Assays wurden je 200 µl des Zellextrakts in eine Halbmikro-Küvette pipettiert und in dem Photometer platziert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl einer ONPG-Lösung (Tab. 2.40) in die Küvette gestartet. Die ONPG-Lösung war zuvor auf 30 °C vorgewärmt worden. Die Messung der Absorption bei OD₄₂₀ erfolgte über einen Zeitraum von 15 min, wobei in Intervallen von 30 s gemessen wurde. Den Referenzwert bildete ein Ansatz aus 800 µl ONPG-Lösung (Tab. 2.42) und 200 µl Lysepuffer (Tab. 2.40). Die ermittelten Werte der β-Galaktosidaseaktivität wurden gegen die Zeit aufgetragen. Nach erfolgter Messung wurde aus dem linearen Bereich des Absorption-Zeit Diagramms die Steigung ermittelt.

In einem anschließenden Bradfordassay (Bradford, 1976; Kap. 2.9.5.4) wurde die Gesamtproteinkonzentration in den Reaktionsansätzen bestimmt. Dafür wurde eine 1:10 Verdünnung der Proben mit Z-Puffer (Tab. 2.40) durchgeführt und ein Mastermix aus Z-Puffer und Roti[®] Quant (Roth) angesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 700 µl Z-Puffer mit 200 µl Roti[®] Quant vermengt und 100 µl der zu untersuchenden Probenverdünnung zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ der Reaktionsansätze im Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) gemessen. Anhand einer zuvor erstellten Eichgerade mit Rinderalbumin (BSA) konnten die Proteinmengen der Proben bestimmt werden.

In Anlehnung an die Berechnung nach Miller (Miller, 1972) wurde die β-Galaktosidaseaktivität als Units in nmol freigesetztes ONP pro mg Protein pro Minute berechnet. Dabei kam folgende Formel zum Einsatz:

$$\text{Units} = \frac{s \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot m} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

mit:

$$s = \text{Steigung des Absorptions-Zeit-Graphen} = \frac{\Delta \text{OD}_{420}}{\Delta t} \left[\frac{1}{\text{min}} \right]$$

V = Reaktionsvolumen = 1 ml

ε = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm

$$= 4,5 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

d = Lichtweg = Dicke der Küvette = 1 cm

m = ermittelte Proteinmenge [mg]

In Tab. 2.40 sind alle für die Durchführung des β-Galaktosidaseassays benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tab. 2.40: Lösungen und Puffer zur Durchführung des β -Galaktosidaseassays.

Komponente	Konzentration / Menge
Z-Puffer	
Na ₂ HPO ₄	60 mmol
NaH ₂ PO ₄	46 mmol
MgSO ₄	1 mmol
β -Mercaptoethanol (Roth)	2,7 ml
H ₂ O	ad 1 l
pH 7 einstellen, nicht autoklavieren und bei 4 °C lagern	
Lysepuffer	
Z-Puffer mit Triton-X-100	0,05 %
ONPG-Lösung	
ONPG (Sigma) in Z-Puffer lösen	1 mg/ml

2.9 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) lassen sich Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld auftrennen. Dabei wird einem SDS-Polyacrylamidgel, das als Trägermaterial dient, eine elektrische Spannung angelegt.

Sobald dem monomeren Acrylamid (AA) der Radikalbildner Ammoniumperoxidsulfat (APS) und den Katalysator N,N,N,N',-Tetramethyldiamin (TEMED) zugegeben werden, polymerisiert dieses. Dabei findet eine Quervernetzung der entstehenden Polyacrylamidketten durch Methylbisacrylamid (BAA) statt. Auf diese Weise entsteht ein Gel mit einer dreidimensionalen Polyacrylamid-Netzstruktur. Bei der Gelelektrophorese wirkt diese Struktur wie ein Sieb: kleine Proteine wandern schnell, wohingegen größere Proteine langsamer wandern, da sie zurückgehalten werden. Durch Veränderung des Konzentrationsverhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid lässt sich die Porengröße dieser Gels variieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE's nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Hierbei wird den Proben das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) zugegeben und diese anschließend durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. SDS lagert sich irreversibel an und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Auf diese Weise entstehen Mizellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit. Die Beweglichkeit der Proteine im Gel ist danach nur noch von ihrem Molekulargewicht abhängig und erfolgt im elektrischen Feld in Richtung Anode.

2.9.1.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden je nach experimentellem Bedarf sowohl kleine (Minigelapparat; BioRad), als auch große SDS-Polyacrylamidgele (Apparatur Eigenbau, Typ Berlin) verwendet. Dabei bestand ein SDS-Polyacrylamidgel immer aus einem oberen, kurzen, weitporigen Sammelgel, das der Konzentrierung der Proben dient und einem unteren, langen, engporigen Trenngel, in dem die Proteinauftrennung stattfindet. Das Sammelgel war bei allen Gelen 5 %ig mit einem AA:Bisacrylamid (BAA)-Verhältnis von 30:0,8. Die Prozentigkeit und das AA:BAA-Verhältnis variierte bei den Trenngelen hingegen, je nach erwünschter Auftrennung der Proteine. SDS-Polyacrylamidgele, die zur Auftrennung von Proteinen für anschließende Western-Blot Analysen dienten, oder für die Überexpressions- bzw. Protein-Interaktion Studien verwendet wurden, waren 10, 12,5 oder 15 %ig und hatten ein AA:BAA-Verhältnis von 30:0,8.

Sobald SDS-Polyacrylamidgele dazu verwendet wurden, Penicillin-Bindeproteine mittels Bocillin zu markieren, wurden zur besseren Auftrennung der PBP2-Gruppe 7,5 %ige Gele mit einem AA:BAA-Verhältnis von 30:1,1 hergestellt. Die einzelnen Zusammensetzungen der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele sind der Tab. 2.41 zu entnehmen.

Vor der Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst alle verwendeten Gegenstände zuerst mit H₂O, dann mit Ethanol (70 %, p.a.) gereinigt und mit fusselfreien Tüchern trocken gerieben. Dabei wurden Handschuhe getragen, um Kontaminationen mit Proteinen zu vermeiden. Bei den kleinen Gelen wurden die Abstandshalter (1 mm) an beiden Seitenränder zwischen zwei Glasplatten platziert und anschließend in die Apparatur eingespannt. Bei den großen Gelen wurden ebenfalls zwei Abstandshalter (1,2 mm) beidseitig zwischen zwei Glasplatten gelegt und mit Hilfe von vier Klammern fixiert. Ein Kunststofffuß wurde mit 1,5 %iger Agarose gefüllt und das Sandwich aus Glasplatten mit befestigten Abstandshaltern in die noch flüssige Agarose gestellt. Nach vollständigem Aushärten der Agarose konnte das Trenngel zwischen die zwei abgedichteten Glasplatten gegossen werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Trenngel ca. 1 cm unterhalb der Probenaschen endete. Die gegossene Trenngelmischung wurde mit Isopropanol (100 %, p.a.) überschichtet, um eine glatte Grenzfläche zu erhalten und 2 h zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Das Isopropanol wurde abgegossen und die restliche Feuchtigkeit zwischen den Glasplatten mit einem Stück Whatman-Papier aufgesaugt. Das Sammelgel wurde gegossen und mit dem gereinigten Probenkamm luftblasenfrei versehen. Sobald die Trenngelmischung auspolymerisiert war, wurden die Klammern entfernt und das SDS-Polyacrylamidgel vorsichtig aus dem Agarosefuß gezogen. Das Gel konnte entweder direkt verwendet werden, oder in feuchte Tücher gehüllt bei 4 °C für längere Zeit gelagert werden.

Tab. 2.41: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Komponente	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O bidest.	5,25 ml	6 ml	4,65 ml	3,45 ml	2,85 ml
Rotiphorese® Gel 30 ¹	-	4,95 ml	6,15 ml	6,25 ml	0,85 ml
Rotiphorese® Gel A ²	3,75 ml	-	-	-	-
Rotiphorese® Gel B ³	2,06 ml	-	-	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	-	-	1,25 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	25 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	2,5 µl
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	5 ml

Für kleine BioRad-Gele wurde 1/3 der angegebenen Mengen verwendet.

¹ 30 % AA; 0,8 % BAA, Carl Roth; ² 30 % AA, Carl Roth; ³ 2 % BAA, Carl Roth

2.9.1.2 Herstellung der Zellysate

Zellysate wurden hergestellt, um die Proteine von *S. pneumoniae* Stämme mittels Western-Blot (Kap. 2.9.4) oder nach einer Markierung der Penicillin-Bindeproteine mit Bocillin (Kap. 2.9.3) untersuchen zu können.

Zur Herstellung von Zellysaten wurden die zu untersuchenden Stämme, wie bereits in Kap. 2.6.2 beschrieben, angeimpft und hochgezogen. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurde jeweils 2 ml einer trüben Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT und 14.000 rpm in einer Eppendorfcentrifuge (Centrifuge 5415 C, Eppendorf GmbH) herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Bakterienpellet in 20 mM Natriumphosphatpuffer (Tab. 2.42) mit 0,2 % Triton X 100 gelöst. Die Menge des dabei eingesetzten Puffers wurde zuvor berechnet, da die aufgetragenen Zellysatsmengen bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese identisch sein sollten. Für die Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Natriumphosphatpuffer [ml]} = \frac{N}{20} \times V \text{ [ml]} \times 5 \mu\text{l}$$

mit:

N= tatsächliche Zelldichte [N]

V= Kulturvolumen [ml]

Nachdem die Bakterienpellets vollständig gelöst waren, wurden sie für 30 min bei 37 °C lysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -80 °C gelagert werden.

Tab. 2.42: Zusammensetzung des Natriumphosphatpuffers.

Komponente	Volumen
Na ₂ HPO ₄ (20 mM)	72 ml
NaH ₂ PO ₄ (20 mM)	28 ml

2.9.1.3 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurde sowohl bei den kleinen, als auch bei den großen SDS-Polyacrylamidgelen zunächst der Probenkamm vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt. Kleine Gele wurden in die Gelelektrophorese-Apparatur (BioRad) eingebaut. Große Gele wurden in die vertikale Elektrophorese Apparatur (Apparatur Eigenbau, Typ Berlin) gestellt und mit vier Klammern befestigt. Nachdem die Kammer mit Laemmli-Laufpuffer (1x) gefüllt war, wurden die Proben taschen ausgerichtet und gründlich gespült. Die Proben wurden mittels 50 µl Spritze (Microliter Syringe, Hamilton) aufgetragen. Um die Molekularmassen der untersuchten Proteine bestimmen zu können, wurden Proteinmarker mit aufgetragen: Proteinmarker peqGold II (PeqLab) bei Coomassiegelen und Prestained Marker (Proteinmarker IV, PeqLab), wenn anschließend eine Immunodetektion mittels Western-Blot durchgeführt wurde. Nicht benötigte Taschen wurden mit dem gleichen Volumen (2x) Laemmli-Probenpuffer (Tab. 2.43) beladen, um ein gerades Laufverhalten der Proben sicherzustellen. Die Gelelektrophorese wurde bei kleinen Gelen ca. 1 h bei 100 V durchgeführt. Bei großen Gelen dauerte die SDS-Gelelektrophorese ca. 3 h bei 35 mA. Fand das SDS-Gel zur Detektion von Penicillin-Bindeproteinen mittels Bocillin Verwendung (Kap. 2.9.3), wurde das es so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers knapp aus dem Gel herausgelaufen war. In Tab. 2.43 sind die Puffer und Lösungen aufgeführt, die für die SDS-Gelelektrophorese und für die anschließende Coomassie-Färbung benötigt wurden.

Tab. 2.43: Lösungen und Puffer für die SDS-Gelelektrophorese und für die anschließende Coomassie-Färbung.

Komponenten	Konzentration /Volumen
Coomassie-Färbelösung	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
über Nacht im geschlossenen Gefäß rühren und filtrieren	
Entfärber 1	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
Entfärber 2	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
2x Laemmli-Probenpuffer	
H ₂ O bidest.	1,875 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
50 % Glycin	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
2-Mecaptoethanol	0,750 ml

Komponenten	Konzentration /Volumen
5x Laemmli-Laufpuffer	
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O bidest.	ad 2000 ml

2.9.2 Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgеле

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989) wurden Proteine in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Sie diente hauptsächlich zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen auf dem Gel.

Hierfür wurde der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillantblau verwendet. Dieser bindet im sauren Milieu unspezifisch an Proteine, indem er sich an die basischen Seitenketten der Aminosäure anlagert und dabei einen Farbstoffkomplex bildet. Für die Färbung wurde ein Trenngel in eine Plastikschale gelegt, mit der Coomassie-Färbelösung (Tab. 2.43) überschichtet und mindestens 3 h oder über Nacht auf einem Schüttler (Modell 3015, Gesellschaft für Labortechnik GmbH) in dieser geschwenkt. Zur Entfärbung wurde nach dem Entfernen der Coomassie-Färbelösung Entfärber 1 (Tab. 2.43) zugegeben und das Gel zweimal für jeweils eine halbe Stunde entfärbt. Schließlich wurde der Entfärber 1 durch den Entfärber 2 ersetzt und das Gel solange entfärbt bis der Hintergrund deutlich entfärbt war und die einzelnen Proteinbanden gut zu sehen waren. Färbe- und Entfärbeprozesse konnten beliebig oft wiederholt werden. Die SDS-Gele wurden zur Dokumentation an einem Flachbettscanner (Epson Perfection 4990, PHOTO, Epson) eingescannt oder an einem Makrostand abfotografiert.

2.9.3 Detektion von Penicillin-Bindeproteinen mit Bocillin

Penicillin-Bindeproteine können in Zelllysaten mit Hilfe von BocillinTM FL (Invitrogen), einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat (Zhao *et al.*, 1999) markiert werden. Hierfür wurden 5 µl einer Zelllysate Probe mit Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,2; Tab. 2.42), der Triton X-100 (Endkonzentration 0,2 %) beinhaltet, mit 3 µl BocillinTM FL (Endkonzentration: 0,5-5,8 µM) auf Eis gemischt, so dass das Endvolumen 12 µl betrug. Die Proben wurden danach 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 12 µl Laemmli-Probenpuffer (Tab. 2.43) wurden die Proben für 2 min bei 95 °C in einem Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) aufgekocht. Zur Sedimentation von Zellfragmenten wurden die Proben kurz bei 14.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf) und dann komplett in die Probenaschen eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels (Tab. 2.41) pipettiert. Die Gelelektrophorese des SDS-Polyacrylamidgels erfolgte nach Kap. 2.9.1.3.

Um die Penicillin-Bindeproteine zu detektieren, wurde zunächst das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit Hilfe des Fluorimager (FluorImagerTM 595, Molecular Dynamics) eingescannt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte anhand der Software Scanner Control und ImageQuant (Version 5.3, Molecular Dynamics). Das Gel wurde im Anschluss einer Coomassie-Färbung (Kap. 2.9.2) unterzogen und somit ungleich aufgetragene Probenmengen ausgeschlossen.

2.9.4 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Western-Blot Analysen (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981) dienen dazu Proteine nach einer erfolgten Trennung mit Hilfe von SDS-PAGE (Kap. 2.9.1) und einer angelegten elektrischen Spannung auf eine Membran zu transferieren, um eine anschließende Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern zu ermöglichen.

Zunächst wurden alle für eine Analyse mittels Western-Blot benötigten Lösungen, die in Tab. 2.44 aufgelistet sind, angesetzt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zelllysate (Kap. 2.9.1.2) mit dem (2x) Laemmli-Probenpuffer (Tab. 2.43) gemischt; wobei je nach experimentellen Bedarf unterschiedliche Zelllysatmengen eingesetzt wurden. Wenn der Western-Blot zur Detektion von PBP2x, PBP1a oder HtrA diente, wurden 3-5 µl Zelllysate mit der entsprechenden Menge Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt. Sobald im Anschluss eine GFP-Detektion erfolgte, wurden 10 µl der Zelllysate mit 10 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) gemischt. Nach dem 2-minütigen Aufkochen der Proben bei 95 °C in einem Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt (Centrifuge 5415, Eppendorf) zur Sedimentation von Zellfragmenten bei 14.000 rpm. Danach wurden die Überstände komplett in die Probentaschen der SDS-Polyacrylamidgele gefüllt. Die Prozentigkeit der Gele variierte dabei je nach Größe der zu detektierenden Proteine. Wenn in der anschließenden Immunodetektion PBP2x oder PBP1a nachgewiesen wurden, kamen in der Regel 10 %ige SDS-Gele zum Einsatz. Sobald eine bessere Auftrennung erforderlich war, wie bei der Detektion der kleinen Proteine HtrA und GFP, wurden 12,5 %ige SDS-Gele verwendet. Dabei wurden insgesamt sowohl große, als auch kleine SDS-Gele benutzt. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte wie bereits in Kap. 2.9.1.3 beschrieben. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurde das Sammelgel entfernt und mit dem Trenngel weitergearbeitet. Bei allen folgenden Arbeitsschritten wurden Handschuhe ohne Talkum getragen. Eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm (PeqLab) wurde auf Gelgröße zugeschnitten, mit Hilfe einer Pinzette in ein Plastikschälchen gelegt und durch das Schwenken mit Methanol (100 %, p.a.) aktiviert. Nach dem Waschen in H₂O wurde die Membran bis zum Zusammenbau des Blots in Blotpuffer (Tab. 2.44) gelegt. Pro Blot wurden vier Filterpapiere (Whatmann) zugeschnitten und mit zwei Polsterschwämmen in Blotpuffer getränkt. Der Blotaufbau erfolgte wie in Abb. 2.12 dargestellt. Dabei wurde sichergestellt, dass alle Einzelkomponenten ausreichend mit Blotpuffer befeuchtet wurden und dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen bildeten.

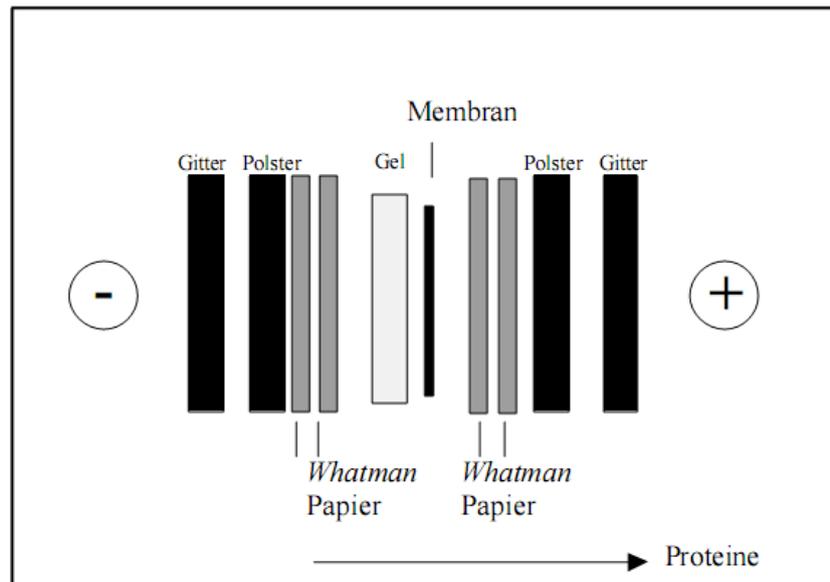


Abb. 2.12: Aufbau eines Western-Blots. Dargestellt wurde die korrekte Anordnung der einzelnen Komponenten eines Western-Blots. Dabei stehen + bzw. - für die Anode, bzw. Kathode. Ein schwarzer Pfeil kennzeichnet die Transferrichtung der Proteine.

Anschließend wurde der Blot in die Blot-Apparatur gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran zur Anode und das SDS-Gel zur Kathode ausgerichtet waren. Die Apparatur wurde mit Blotpuffer gefüllt, so dass der Blot vollständig bedeckt war. Es wurden zwei Blot-Apparaturen mit unterschiedlicher Größe verwendet. Zum Blotting von kleinen SDS-Gele kam eine kleine Apparatur (BioRad) zum Einsatz, mit der 1 h bei 100 Volt geblottet wurde. Ein Plastikeinsatz mit Eis verhinderte dabei das Überhitzen der Proteine. Sobald große SDS-Gele geblottet wurden, erfolgte dies in einer großen Apparatur (Trans-Blot Cell, Bio Rad) für 3 h bei 100 Volt. Dabei wurde der Blot durch eine Kühlschleife kontinuierlich auf 15 °C gehalten.

Nach erfolgreichem Western-Blot wurde die Apparatur abgebaut, die PVDF-Membran in eine Plastikschiene gelegt und mit PBST für 30 min bei RT (Tab. 2.47) geschwenkt (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik). Bei diesem Blockschnitt werden überschüssige Proteinbindungsstellen gesättigt und dadurch eine unspezifische Bindung der später zugegebenen Nachweisreagenzien verhindert. Anschließend folgte ein 2-minütiger Waschschnitt mit PBST. Diente der durchgeführte Western-Blot dem Nachweis von GFP bzw. GFP-Fusionsproteinen, wurde die Membran 30 min mit TTBS-Puffer (Tab. 2.46), der zusätzlich 0,5 % Casein enthielt, geblockt.

Im Anschluss folgte eine Inkubation der Membran mit einer Verdünnung des ersten Antikörpers (Tab. 2.47). Bei kleinen Membranen wurden 10 ml und bei großen 20 ml der Antikörperverdünnung eingesetzt. Alle primären Antikörper, bis auf Anti-GFP (Invitrogen) wurden in PBST verdünnt. Bei dem Antikörper Anti-GFP erfolgte die Verdünnung in TTBS-Puffer mit 0,5 % Casein. Nach Zugabe der Antikörperlösung wurde die Membran 1 h (Anti-GFP: 2h) bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der erste Antikörper von der Membran heruntergewaschen. Dabei wurde die Membran 2 min in PBS (Tab. 2.46), zweimal 5 min in PBST (Tab. 2.46) und danach erneut

für 2 min in PBS geschwenkt. Bei Blots zur Detektion von GFP-Proteinen wurde der erste Antikörper durch dreimaliges 5-minütiges Waschen der Membran mit TTBS (Tab. 2.44) entfernt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit der Verdünnung des zweiten Antikörpers (Tab. 2.45), wobei auch hier jeweils PBST bzw. TTBS mit 0,5 % Casein zur Verdünnung verwendet wurden. Es folgten dieselben Waschschrirte, wie bei der Entfernung des ersten Antikörpers.

Die Membran wurde anschließend in eine saubere Plastikschaie gelegt und je nach Größe entweder in 10 oder in 20 ml Blotsubstratpuffer (Tab. 2.44), der auf 37 °C vorgewärmt war, 5 min geschwenkt. Der Blotsubstratpuffer wurde durch die gleiche Menge erwärmter Blotfärbelösung (Tab. 2.44) ersetzt. Dabei wurde die Blotfärbelösung kurz vor der Verwendung angesetzt.

In der Blotfärbelösung befinden sich die Reagenzien BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat), ein instabiles p-Toluidin Salz und NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid). Durch Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, wird eine Phosphatgruppe von BCIP abgespalten. In der darauf folgenden Redox-Reaktion wird das entstandene Produkt oxidiert und NBT reduziert. Dabei entstehen blauviolette Immunokomplexe, die nach 3-10 minütiger Inkubation im Dunkeln als Banden auf der Membran zu sehen sind. Die Färbereaktion wurde durch dreimaliges Waschen für 2 min mit 20 ml H₂O bidest. gestoppt. Nach dem Trocknen zwischen zwei Filterpapieren (Whatman) wurde der Blot mit einem Laser-Scanner (Flachbrettscanner) eingescannt und mit Hilfe der Software Adobe®Photoshop®Elements (Version 2.02, 190-2002) dokumentiert. Nach einmaliger Immunodetektion konnte die PVDF-Membran bei experimentellem Bedarf durch das Schwenken in Methanol (100 %, p.a.) erneut aktiviert werden. Anschließend konnte eine erneute Immunodetektion mit einem andern Antikörper, wie bereits beschrieben, stattfinden. In Tab. 2.45 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tab. 2.44: Lösungen für den Western-Blot.

Komponente	Menge / Volumen
Blotpuffer	
Glycin	36,05 g
Tris	7,55 g
H ₂ O	ad 5 l
20 x PBS (phosphate buffered saline)	
NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	28,8 g
KH ₂ PO ₄	4 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l
PBST	
PBS (20x)	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O bidest.	ad 2 l

Komponente	Menge / Volumen
TTBS	
100 mM Tris	6,057 g
0,9 % NaCl	4,5 g
pH mit HCl auf 7,5 eingestellt, autoklaviert	
<u>Zugabe kurz vor der Verwendung:</u>	
0,2 % Tween 20 Endvolumen	1 ml
	500 ml
Blotsubstrat-Puffer	
100 mM Tris	50 ml einer 1 M Lösung
100 mM NaCl	50 ml einer 1 M Lösung
5 mM MgCl ₂	5 ml einer 0,5 M Lösung
pH 9,5 mit 1N HCl einstellen	
H ₂ O bidest.	ad 500 ml
Blotfärbelösung	
Blotsubstratpuffer	10 ml
NBT /BCIP (Roche)	60µl
BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat; NBT: 4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid	

Tab. 2.45: Verwendete Antikörper.

Detektion von	1. Antikörper	Verdünnung des 1. Antikörpers	2. Antikörper	Verdünnung des 2. Antikörpers	Referenz
PBP2x	Anti-PBP2x 1646 (polyklonal) affinitätsgereinigt	1:10.000	1	1:30.000	Hakenbeck <i>et al.</i> , 1991
PBP1a	Anti-PBP1a (301) monoklonal	1:400	2	1:1.000	Hakenbeck <i>et al.</i> 1991
GFP	Anti-GFP, rabbit IgG fraction (polyclonal)	1:2.000	1	1:10.000	Invitrogen TM
HtrA	Anti-HtrA (polyklonal)	1:1.000	1	1:30.000	Sebert <i>et al.</i> , 2005
HtrA	Anti-HtrA 12003 (polyklonal)	1:30.000	1	1:30.000	diese Arbeit
HtrA	Anti-HtrA 12004 (polyklonal)	1:30.000	1	1:30.000	diese Arbeit

¹ goat-anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated (Sigma)

² goat-anti-mouse 1:1.000 alkaline phosphatase (Sigma)

2.9.4.1 Quantifizierung von Proteinmengenunterschieden mittels ECL

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der PBP2x-Mengenunterschied in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 und C405 (Tab. 2.1) quantitativ mit der Methode der ECL (enhanced chemiluminescence) analysiert. Hierfür wurden die zu untersuchenden *S. pneumoniae* Stämme R6 und C405 zunächst bei 37 °C in C-Medium angezogen und Zelllysate hergestellt (Kap. 2.9.1.2). Das GST-PBP2x (ab AS 49) Protein wurde überexprimiert (Kap. 2.9.5.1) und in diesem Experiment in Form einer Eichgerade aufgetragen. Die Zelllysate und ihre Verdünnungen wurden mit den jeweiligen Mengen Laemmli-Probenpuffer (2x) gemischt. Die Verdünnungen einer geeigneten Elution des GST-PBP2x-Proteins wurden eben-

falls mit dem Laemmli-Probenpuffer (2x) vermengt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95 °C im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) aufgekocht und kurz bei 14.000 rpm herunterzentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig auf ein kleines 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese (Kap. 2.9.1.3) erfolgte 2 h bei 80 Volt.

Alle Proben wurden für jedes durchgeführte Experiment in doppelter, identischer Ausführung hergestellt und bei gleicher Beladung auf zwei SDS-Gele aufgetragen. Ein SDS-Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen mittels Coomassie-Färbung untersucht (Kap. 2.9.2). Das zweite Gel wurde in ein Western-Blot Experiment eingesetzt.

Im Gegensatz zum standardmäßig durchgeführten Western-Blot (Kap. 2.9.4) wurde anstelle einer PVDF-Membran eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, Sigma-Aldrich Whatman) mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet. Diese benötigte keine Aktivierung in Methanol (100 %, p.a.). Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte wie bereits unter Kap. 2.9.4 beschrieben. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in einem PBST-Puffer geblockt, der sowohl 5 % Skim Milk (DIFCO), als auch 0,1 % Tween20 beinhaltete. Zum Blocken wurde die Membran unter leichtem Schütteln (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik) 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten ein 15-minütiger und zwei 5-minütige Waschschrte in PBST-Puffer. Von dem primären Antikörper, Anti-PBP2x (Tab. 2.45), wurde eine 1:10.000 Verdünnung in PBST-Puffer mit 5 % Skim Milk (DIFCO) und 0,1 % Tween20 hergestellt. Der Blot wurde in 10 ml dieser Antikörperverdünnung 1 h bei RT inkubiert. In drei 3-minütigen Waschschrten mit PBST wurde der primäre Antikörper herunter gewaschen. Der sekundäre Antikörper, goat-anti-Rabbit IgG HRP-conjugated (ECL, Thermo Scientific) wurde im gleichen Puffer verdünnt wie bereits der primäre Antikörper. Der Blot wurde in 10 ml einer 1:5.000 Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten die gleichen Waschschrte wie bei dem primären Antikörper. Nach einem letzten Waschschrte mit PBS (1x) war der Blot bereit für die Detektion.

Für die Durchführung der ECL-Detektion standen freundlicherweise Geräte und Arbeitsmaterial in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Friauf (AG Tiephysiologie, TU Kaiserslautern) zur Verfügung. Zur Detektion wurde das SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses ultrasensitive und verbesserte ECL Substrat eignet sich für die Detektion der Peroxidase-Aktivität von Antikörpern, die mit HRP (horseradish peroxidase, Peroxidase aus dem Meerrettich) konjugiert sind. Das Enzym HRP katalysiert die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalate. Dabei entsteht Chemilumineszenz, die wiederum mit Hilfe des vollautomatischen Geräts ODYSSEY® Fc (Dual-Mode Imaging System, Li-COR Biosciences) detektiert wurde. Die anschließende Auswertung und Dokumentation erfolgte anhand der Software LI-COR, Image Studio (Version 2.0).

2.9.5 Überexpression von Proteinen

2.9.5.1 Überexpression von Proteinen mittels GST-Tag

Die Proteine GST-PBP2x aus R6, C405 und C606 wurden in dieser Arbeit überexprimiert um im Anschluss mögliche Strukturunterschiede der Proteine mittels Zirkulardichroismus-Spektrometrie analysieren zu können (Kap. 2.11). Dafür wurden die Plasmide pGEX-6P1-tet wt 2x, pGEX-6P1-tet C405 2x und pGEX-6P1-tet C606 2x (Tab. 2.4), die im Rahmen einer Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie der TU Kaiserslautern konstruiert wurden (Koch, 2006), verwendet. Diese Plasmide besitzen jeweils ein PBP2x ab AS 49, das N-Terminal mit einem GST-Tag (GST = Glutathion-S-Transferase) fusioniert ist. Dieses Konstrukt steht wiederum unter der Kontrolle des Isopropyl-s-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) -induzierbaren Promotors P_{tac} . Somit wurden nach IPTG-Zugabe GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie über eine Säule mit GSH-Sepharose wurden die Proteine anschließend gereinigt.

Die Plasmide (Tab. 2.4) wurden für die Überexpression in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLys S Zellen (Tab. 2.3) transformiert. Jeweils eine Einzelkolonie pro erstellten Stamm wurde von der Selektionsplatte mit Antibiotikum gepickt und 50 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin damit beimpft. Diese Vorkultur wurde schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ (Ultraspex 500, Biochrom Ltd.) dieser trüben Kulturen zunächst bestimmt und jeweils 1 l vorgewärmtes LB-Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin, so inokuliert, dass die OD₆₀₀ ca. 0,3 betrug. Die weitere Inkubation erfolgte weiterhin unter Schütten bei 37 °C, wobei das Wachstum regelmäßig gemessen wurde. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von 1-1,2 erreicht hatten, wurden jeweils 500 µl der Probe steril entnommen, 2 min bei 14.000 rpm herunterzentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf GmbH), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 80 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) aufgenommen. Diese Proben wurden 5 min bei 95 °C aufgekocht und konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden. Sie dienten in einer folgenden SDS-PAGE als Kontrollen. Die Kulturen wurden anschließend mit 0,5 mM IPTG (Applichem) versetzt und über Nacht unter Schütteln bei 19 °C inkubiert. Die OD₆₀₀ der Kulturen wurde gemessen und danach pro Kultur eine Probe mit angepasster Menge entnommen und wie bereits beschrieben behandelt. Die trüben Kulturen wurden in sterile JA-10 Zentrifugenbecher gefüllt und im Anschluss für 15 min bei 8.000 rpm und 4 °C (Modell J2-21, Rotor JA-10, Beckman Instruments) abzentrifugiert. Die entstandenen Bakterienpellets wurden in jeweils 30 ml PBSKM-Puffer (Tab. 2.46) gelöst und in sterile 50 ml Falcon-Gefäße überführt. Die Proben wurden 7-mal für jeweils 2 min mit Ultraschall behandelt (Branson sonifier B-12, Stufe 7). Dabei befanden sich die Proben auf Eis und zwischen den Ultraschallbehandlungen wurden 2-minütige Pausen gemacht, um ein Überhitzen des Geräts zu verhindern. Die Lysate wurden in sterile JA-20 Zentrifugenbecher überführt und für 40 min bei 4 °C und 17.000 rpm zentrifugiert (Modell J2-21, Rotor JA-20, Beckman Instruments). Die Überstände wurden in Falcon-Röhrchen dekantiert und die Pellets in 30 ml PBSKMT-Puffer gelöst. Sowohl von den Überständen, als auch von den Pellets

wurden jeweils 10 µl für eine SDS-PAGE entnommen, mit 10 µl Laemmli-Probenpuffer vermengt, 5 min bei 95 °C aufgekocht und bei -20 °C gelagert.

Die GSH-Sepharose (Amersham-Biosciences) wurde gemischt, 2 ml dieser dickflüssigen Mischung wurden in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und mit 40 ml PBSKMT-Puffer 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert (Hermle Z513K, Axon). Der Überstand wurde verworfen und die Zentrifugation wiederholt um das Ethanol, indem die Sepharose gelagert war, vollständig zu entfernen.

Der gewaschenen GSH-Sepharose wurde der Überstand zugegeben und das Gemisch 1-2 h rollend bei 4 °C inkubiert. Danach wurde dieses in eine Leersäule (Econo-Pac Disposable Chromatography Columns, Bio-Rad) gefüllt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und davon eine 10 µl Probe entnommen und wie bereits beschrieben behandelt. Diese wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit 20 ml PBSKMT-Puffer (Tab. 2.46) folgte ein einmaliger mit 20 ml PBSKM-Puffer (Tab. 2.46). Eine 10 µl Probe des Waschschrifts wurde entnommen und dementsprechend behandelt.

Um die an der GSH-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine von der Säule zu eluieren, wurde ein frisch angesetzter Elutionspuffer (Tab. 2.46) verwendet, der einen Überschuss an freiem GSH enthält. Es wurden je Säule 6-7 Fraktionen mit 1 ml Elutionspuffer aufgetragen und die einzelnen Elutionen in ERGs aufgefangen. Pro Elution wurden 10 µl für die SDS-PAGE entnommen. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Elutionen wurden am Nanodrop bestimmt. Nachdem Umpuffern (Kap. 2.9.5.3) von Elutionen mit hoher Konzentration, wurden diese entweder direkt in ein Experiment eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Überexpression von GST-HtrA_{S234A} wurde zunächst das Plasmid pKP03 hergestellt. Hierfür wurde das Gen *htrA*_{S234A} mit Hilfe einer PCR mit der i-Proof DNA-Polymerase und den Oligonukleotiden *htrA_overex_SalI_r* und *htrA_overex_BamHI_f* (Tab. 2.18) amplifiziert (Kap. 2.7.2.3). Das aufgereinigte PCR-Produkt und der Vektor pGEX-6P-1 (Tab. 2.4) wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I verdaut (Kap. 2.7.2.1), aus dem Agarosegel eluiert (Kap. 2.7.1.5) und ligiert (Kap. 2.7.2.2). Anschließend erfolgte eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen (Kap. 2.6.7). Selektioniert wurde dabei mit 100 mg/ml Ampicillin. Es folgt eine Kontrolle der Transformanten mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.7.2.3) und eine Isolation und Sequenzierung des hergestellten Plasmids pKP03. Das Plasmid wurde zur Überexpression in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLys S und *E. coli* JM109 (Tab. 2.3) transformiert. Die Überexpression erfolgte dabei wie bereits für die GST-PBP2x-Proteine beschrieben. Das überexprimierte Protein GST-HtrA_{S234A} war bei allen durchgeführten Versuchen jedoch unlöslich und befand sich im Pellet.

In Tab. 2.46 sind alle für die Überexpression von GST-Fusionsproteinen verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tab. 2.46: Verwendete Puffer und Lösungen für die Überexpression von GST-Fusionsproteinen.

Komponente	Konzentration	Volumen/Menge
PBSKM-Puffer pH 7,3		
MgCl ₂	1 mM	1 ml (1M Stammlösung)
KCl	3 mM	1,5 ml (2M Stammlösung)
PBS 1x		100 ml 10x PBST ad 1.000ml H ₂ O
PBSKMT-Puffer pH 7,3		
MgCl ₂	1 mM	1 ml (1M Stammlösung)
KCl	3 mM	1,5 ml (2M Stammlösung)
PBS 1x		100 ml 10x PBST
Tween 20	0,1 %	10 ml (10 % ige Stammlösung) ad 1.000 ml H ₂ O
Elutionspuffer pH 8,0		
Tris pH 8,0	50 mM	1 ml (1 M Stammlösung)
GSH	10 mM	64,1 mg ad 20 ml H ₂ O

Abspaltung des GST-Tags mittels PreScission Protease

Mit Hilfe des Enzyms PreScission Protease (Amersham Pharmacia Biotech) kann der GST-Tag von GST-Fusionsproteinen an einer bestimmten Erkennungssequenz spezifisch abgespalten werden. Dies ist möglich, da die für die Überexpression Vektoren (pGEX6-P1-tet und pGEX-6P-1) verwendet wurden, die diese Erkennungssequenz, die sich upstream der Multiple Cloning Site (MCS) befindet, beinhalten. Das Enzyme PreScission Protease ist selbst ein Fusionsprotein aus der menschlichen Rhinovirus 3C PreScission Protease mit GST. Somit kann das Enzym nach dem Abspalten des GST-Tags mittels eigenen GST-Tags an das Säulenmaterial gebunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der GST-Tag von GST-PBP2x (ab AS 49) Fusionsproteinen abgespalten, bevor diese in Interaktionsstudien mit Proteinen (Kap. 2.10.2) eingesetzt wurden. Dabei fand die Abspaltung des GST-Tags direkt an der Säule statt, an der die GST-Fusionsproteine gebunden waren. Die Säule wurde zunächst zweimal mit 20 ml PBSKMT- und einmal mit PBSKM-Puffer (Tab. 2.46) gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml Cleavag-Puffer (Tab. 2.47). Die Säule wurde unten mit einem Stopfen verschlossen und 1 ml des Cleavage-Puffers und PreScission Protease nach Herstellerangaben (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben. Das obere Ende der Säule wurde mit Hilfe einem Deckel und Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Die Säule wurde am unteren Ende geöffnet und 1 ml eluiert. In diesem ersten Eluat befanden sich die PBP2x-Proteine ohne GST-Tag. Die Säule wurde zweimal mit 1 ml Cleavage-Puffer gewaschen um restliche Proteine von der Säule zu entfernen. Die Elutionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und ihre Konzentration am Nanodrop ermittelt. Tab. 2.47 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Cleavage-Puffers.

Tab. 2.47: Zusammensetzung des Cleavage-Puffers.

Komponente	Konzentration
Tris/HCl, pH 7	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Dithiothreitol	1 mM

2.9.5.2 Überexpression von Proteinen mittels His₆-Tag

Die Proteine HtrA_{S234A}oTM und HtrAoTM (oTM: ohne Transmembranregion) wurden als N-terminale Fusionen mit His₆ überexprimiert und in einer anschließenden Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Beide Proteine wurden im Anschluss für Protein-Protein Interaktionsstudien (Kap. 2.10) verwendet. Das Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM diente zusätzlich zur Antikörperherstellung (Kap. 2.9.6).

Zunächst wurden ausgehend von dem Überexpressionsplasmid pQE-80L-Kan (Tab. 2.4) die Plasmide pKP04, pKP041 und pKP042 (Tab. 2.4) konstruiert. Für die Herstellung des Plasmids pKP04 wurde das Gen *htrA*_{S234A} mit den Primern *htrA_overex_SalI_r* und *htrA_overex_BamHI_f* (Tab. 2.18) in einer PCR mit der iProof DNA-Polymerase (Kap. 2.7.2.3) amplifiziert. Bei der Herstellung der Plasmide pKP041 und pKP042 fand die Amplifikation des Gens *htrA* bzw. *htrA*_{S234A} dagegen mit den Oligonukleotiden *htrA_oTM_BamHI_f* und *htrA_overex_SalI_r* (Tab. 2.18) statt. Dabei wurde der vordere Bereich des Gens, der für den Transmembranbereich bzw. dem Signalpeptid des Protein kodiert, nicht amplifiziert. Die erstellten PCR-Produkte wurden nach der Aufreinigung, ebenso wie der Vektor pQE-80L-Kan mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SalI* geschnitten (Kap. 2.7.2.1), aus dem Agarosegel eluiert (Kap. 2.7.1.5), ligiert (Kap. 2.7.2.2) und in kompetente *E. coli* DH5a Zellen transformiert (Kap. 2.6.7.2). Selektioniert wurde dabei mit Kanamycin (25 µg/ml). Erhaltene Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.7.2.3) überprüft. Es folgte eine Isolation (Kap. 2.7.1.2) und Sequenzierung (Kap. 2.7.2.4) der hergestellten Plasmide pKP04, pKP041 und pKP042. Danach wurden die Plasmide zur Überexpression in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert.

Die Überexpression der Proteine erfolgte im Grunde genommen genauso wie bereits für GST-Fusionsproteine beschrieben (Kap. 2.9.5.1). Es wurden jedoch andere Puffer (Tab. 2.48), ein anders Selektionsantibiotikum (Kanamycin 25 µg/ml) und Ni²⁺-Agarose (Agarose) als Säulenmaterial verwendet. Die Induktion erfolgte zudem mit 1 mM IPTG 3-4 h schüttelnd bei 30 °C.

In Tab. 2.48 sind alle Lösungen, die für die Überexpression und Aufreinigung von His₆-Tag Proteinen verwendet wurden, aufgelistet.

Tab. 2.48: Lösungen für die Aufreinigung von His₆-Tag Proteinen.

Komponente	Konzentration
Lysepuffer	
Tris	50 mM
NaCl	200 mM
β-Mercapatoethanol	2 mM
Imidazol	10 mM
pH 8,0 eingestellt, sterilfiltriert	
Waschpuffer	
Tris	50 mM
NaCl	300 mM
β-Mercapatoethanol	2 mM
Imidazol	20 mM
pH 8,0 eingestellt, sterilfiltriert	
Elutionspuffer	
Tris	50 mM
NaCl	300 mM
β-Mercapatoethanol	2 mM
Imidazol	250 mM
pH 8,0 eingestellt, sterilfiltriert	

2.9.5.3 Umpufferung von Proteinen

Für die Herstellung von Antikörpern sollte das eluierte Protein His₆-HtrA_{S234A}OTM, das sich im Elutionspuffer mit Imidazol befand, das für Kanninchen toxisch ist, Hasen injiziert werden. Daher musste es zuvor in einen geeigneten Puffer umpuffered werden.

Für die durchgeführten Interaktionsstudien (Kap. 2.10) und auch für die Zirkulardichroismus-Spektrometrie (Kap. 2.11) wurden des Weiteren Puffer mit bestimmten Eigenschaften verwendet; dementsprechend wurden die zu untersuchenden Proteine ebenfalls zunächst umpuffered.

Die Umpufferung von Proteinen erfolgte mit PD-10 Säulen (PD-10 Desalting Column, Amersham Biosciences), die in der Lage sind Salze und kleinere Moleküle < 5 kDa zu entfernen. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet, wobei ein Probenvolumen von 2,5 ml aufgetragen wurde. Die Elution fand mit 3,5 ml des gewünschten Puffers in 0,5 ml Fraktionen statt. Nach einer Bestimmung des Proteingehalts wurden die Proben entweder direkt in ein Experiment eingesetzt oder langfristig bei -80 °C gelagert.

2.9.5.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop

Eine Möglichkeit Proteinmengen zu quantifizieren, stellte die Messung der Absorption bei OD₂₈₀ am Spektralphotometer Nanodrop dar. Die ermittelte Absorption ist dabei auf die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan der Proteine zurückzuführen. Anschließend wurde der ermittelte Wert mit dem proteinspezifischen Extinktionskoeffizient multipliziert, um die Proteinkonzentration zu errechnen.

Bei der Durchführung der Messung wurde verfahren, wie bei der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Kap. 2.7.1.6).

Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde zusätzlich anhand einer kalorimetrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976) ermittelt. Bei diesem Assay bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 hauptsächlich an basische Aminosäuren der Proteine. In saurer Lösung kommt es dabei zu einer Absorptionsänderung, welche bei OD₅₉₅ gemessen werden kann. Da Absorptionsänderung ist über einen großen Bereich zur Konzentration proportional, daher lassen sich Proteinkonzentrationen in Flüssigkeiten anhand von einer Eichkurve bestimmen. Zunächst wurde eine Eichgerade mit Rinderse- rumalbumin (BSA) angefertigt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 200 µl Roti[®]- Quant (Roth) mit 10 µl Proteinlösung und 790 µl des Puffers, indem das Protein gelöst war, gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Ein Ansatz ohne Protein dien- te als Referenz. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde an der Eichgerade abgelesen.

Bestimmung mittels UV/VIS Messung

Bei experimentellem Bedarf wurde eine Konzentrationsbestimmung der Proteine an einem UV-Vis Einstrahl-Spektralphotometer (V-630, JASCO) in der Arbeitsgruppe von Juniorprof. Dr. Keller (AG Molekulare Biophysik, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben gear- beitet.

2.9.6 Herstellung und Überprüfung der Antiseren gegen HtrA

Herstellung der Antiseren gegen HtrA

Um polyklonale Antikörper gegen HtrA herzustellen, wurde das Protein HtrA_{S234A}oTM (Protease Ak- tivität inaktiviert) als N-terminales His₆-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS überexprimiert (Kap. 2.9.5.2) und anschließend in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,2) umgepuffert (Kap. 2.9.5.3). Die Herstellung der Antiseren erfolgte durch die Firma SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen. Es wurden zwei Kaninchen für die Antikörperherstellung immunisiert. Ein Antiserum wur- de nach dem 3-Monatsprotokoll, das vier Injektionen und drei Blutungen beinhaltet, hergestellt. Das andere Antiserum wurde nach dem 2-Monatsprotokoll hergestellt. Dieses enthält nur drei Injektionen und zwei Blutentnahmen.

Überprüfung der Antiseren gegen HtrA

Die Spezifität der Antiseren gegen HtrA in den einzelnen erhaltenen Blutungen wurde mit Hilfe von Western-Blots (Kap. 2.9.4) überprüft. Dabei wurde das Protein His₆-HtrAoTM_{S234} in unterschiedlichen Konzentrationen (100, 5, 1 ng) als Positivkontrolle aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten dabei die Proteine BSA (500 ng), GST-PBP2_{x_{wt}} (100 ng) und His₆-ciaHE (100 ng). Zusätzlich wurden je-

weils 5 µl Zellysate der Stämme *S. pneumoniae* R6 (Tab. 2.1) und *S. pneumoniae* KPCL1 (Tab. 2.2) aufgetragen. Die Membran wurde nach erfolgtem Western-Blot in einer 1:500 Verdünnung der erhaltenen Antisera für 1 h bei RT inkubiert. Bei guter Spezifität durften die Proteine, die als Negativkontrolle dienten im Gegensatz zu den Proteinen, die als Positivkontrolle dienten, nicht erkannt werden. Zusätzlich sollte bei der Probe des Stammes *S. pneumoniae* KPCL1 kein Protein im Zellysate nachgewiesen werden, da in diesem Stamm das Gen *htrA* deletiert wurde.

Um eine geeignete Verdünnung der Antikörper gegen HtrA zu ermitteln, wurden die erhaltenen Finalblutungen zusätzlich getestet. Hierfür wurde ein großes 12,5 %ige SDS-Gel verwendet, das neben zwei kleinen Probenfächern an beiden Seiten, zusätzlich zwei große Probenfächer mit einer Länge von 5,3 cm enthält. In einen großen Probenfach wurden jeweils 106 µl Probe (53 µl R6 Lysat und 53 µl 2x Laemmli-Probenpuffer) aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran mit Hilfe eines sterilen Skalpell vertikal in Streifen mit einer Breite von 0,5 cm geschnitten. Jeder Streifen wurde anschließend mit einer anderen Verdünnung des Antikörpers inkubiert. Mit dieser Methode wurden folgende Antikörperverdünnungen getestet: 1:100, 1:300, 1:500, 1:1.000, 1:3.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:30.000 und 1:100.000.

2.10 Protein-Protein Interaktionsstudien

2.10.1 Interaktionsstudien mit β -Casein als Substrat

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Protein-Protein Interaktionsstudien mit den Proteinen His₆-HtrA_{S234A}oTM, His₆-HtrAoTM und β -Casein durchgeführt. In diesen *in vitro* β -Casein Assays sollte der Abbau des β -Caseins durch die Proteaseaktivität des Proteins His₆-HtrAoTM untersucht werden, wobei das Protease-inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM als Negativkontrolle diente.

In Vorversuchen wurden zunächst optimale Bedingungen für den Abbau von β -Casein durch das aktive Protein His₆-HtrAoTM gesucht. Hierfür wurden die in Tab. 2.49 aufgelisteten Puffer als mögliche Reaktionspuffer getestet.

Tab. 2.49: Verwendete Puffer und Lösungen für die Protein-Protein Interaktionsstudien.

Komponente	Konzentration
Puffer A (nach Sebert <i>et al.</i> , 2005)	
NaCl	150 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HCl	50 mM
pH 7,5, sterilfiltriert	
Puffer B	
Natriumphosphatpuffer pH 7,2	20 mM

Komponente	Konzentration
Puffer C (nach Skórko-Glonek <i>et al.</i> , 1995) Tris-HCl pH 8	50 mM
Puffer D HEPES -HCl pH 7,3	50 mM
Puffer E (nach Cassone <i>et al.</i> , 2012) 1x PBS	

Die Experimente wurden sowohl mit einer Elution des Proteins His₆-HtrAoTM durchgeführt, die zuvor in flüssigem Stickstoff weggefroren, als auch mit einer Elution des Proteins, die nach der Isolation auf Eis gehalten worden war. Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten Proteins His₆-HtrAoTM mit 25 µg des Substrats β-Casein gemischt und der Reaktionsansatz mit dem jeweiligen Reaktionspuffer (Tab. 2.49) auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden bei diesem Puffertest für 20 h bei 30 °C bzw. auch bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Vor dem Start der Inkubationszeit wurden bereits 20 µl der Probe entnommen, mit 20 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) vermennt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach erfolgter Inkubation wurden wiederum 20 µl der Probe entnommen und wie bereits beschrieben behandelt. Die Überstände der aufgeköchten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei große 15 %ige SDS-Gele zum Einsatz kamen. Die SDS-Gele wurden im Anschluss mit Coomassie gefärbt (Kap. 2.9.2).

Für die folgenden Versuche wurde eine zuvor weggefrorene Elution von His₆-HtrAoTM und 1x PBS als Reaktionspuffer verwendet. Bei diesen Reaktionsansätzen wurde 12,5 µg β-Casein und 5 µg His₆-HtrAoTM bzw. Protease inaktives His₆-HtrA_{S234A}oTM in 100 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 20 h bei 30 °C bzw. 37 °C im Wasserbad. Nach 0 min, 30 min, 4 h und nach 20 h wurden 20 µl Proben entnommen, wie bereits beschrieben behandelt.

2.10.2 Interaktionsstudien mit PBP2x als Substrat

In diesen *in vitro*-Assays wurden die GST-Fusionsproteine GST-PBP2x aus R6, C405 und C606 als mögliche Substrate für das Protease aktive Protein His₆-HtrAoTM getestet. Das Protease inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM diente dabei als Negativkontrolle.

Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden 12,5 µg Substratprotein mit 5 µg aktiven bzw. inaktiven HtrA-Protein vermennt. Als Reaktionspuffer wurde 1x PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C bzw. 37 °C im Wasserbad. Nach 0 min, 30 min, 4 h und nach 20 h wurden Proben für eine Analyse mittels SDS-PAGE (Kap. 2.9.1.3) entnommen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt (Kap. 2.9.2).

In weiteren *in vitro*-Assays wurden PBP2x aus R6 und C405 als mögliche Substrate für HtrA untersucht, wobei His₆-HtrA_{S234A}oTM erneut als Negativkontrolle diente. Das Reaktionsvolumen dieser Pro-

ben wurde auf 50 μl reduziert. In einem Reaktionsansatz befanden sich 5 μg des His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234o}TM und 6,25 μg des zu testenden PBP2x-Substratproteins. Einem weiteren Ansatz wurde zusätzlich 1 μg β -Casein zugegeben, da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von β -Casein die Proteaseaktivität von HtrA aus *S. pneumoniae* steigert (Cassone *et al.*, 2012). Kontrollansätze beinhalteten nur das jeweilige HtrA Protein mit der identischen Konzentration an β -Casein oder nur das jeweilige Substratprotein. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 37 °C für 20 h, wobei Proben nach 0 min und 20 h gezogen und wie bereits erläutert bearbeitet wurden.

2.11 Zirkulardichroismus-Spektrometrie zur Analyse von Strukturunterschieden in Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gereinigten GST-Fusionsproteine GST-PBP2x ab AS 49 aus R6, C405 und C606 (Kap. 2.9.5.1) mittels Zirkulardichroismus (CD-Spektroskopie) untersucht, um mögliche strukturelle Unterschiede zu bestimmen.

Der Zirkulardichroismus beruht auf dem Unterschied in der Lichtabsorption von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht und tritt auf, sobald ein Molekül ein oder mehrere chirale Chromophoren besitzt. Mit der Methode der CD-Spektroskopie kann die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle untersucht werden, die sich in einer Lösung befinden. Da unterschiedliche Strukturelemente eines Proteins im CD-Spektrum ein charakteristisches Signal besitzen, kann diese Methode unter anderem auch zur Analyse von Sekundärstrukturelementen herangezogen werden (Brahms und Brahms., 1980). Die Durchführung der CD-Spektroskopie fand in der Arbeitsgruppe von Juniorprof. Dr. Keller (AG Molekulare Biophysik, TU Kaiserslautern) statt, in der freundlicherweise Geräte für die Experimente zur Verfügung standen. Die CD-Messungen wurden in dem Zirkulardichroismus-Spektrometer Chirascan plus (Applied Photophysics) durchgeführt. Die CD-Spektren jeder Proteinprobe wurden bei den Betriebstemperaturen 20 °C, 30 °C und 37 °C gemessen. Alle Messungen wurden in der gleichen 1 mm Quarzküvette (polarimetrisch geprüft) durchgeführt, die zwischen den einzelnen Probenmessungen gründlich gereinigt wurde. Das CD-Spektrum der Proben wurde in einem Wellenlängenbereich von 180-260 nm bei einer Schrittgröße von 1 nm und einer Bandbreite von 1nm ermittelt. Zuvor fand eine Eichung des Geräts mit der leeren Quarzküvette statt. Als Referenz dienten zwei Messungen mit 500 μl Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,2). Die zu untersuchenden Proteine waren in dem gleichen Puffer gelöst. Vor dem Start der Messung des CD-Spektrums wurden 500 μl einer 10 μM Proteinlösung in die zuvor gesäuberte Quarzküvette gefüllt. Jeder Messdurchlauf wurde 3-mal wiederholt. Die ermittelte Einheit des Zirkulardichroismus ist die molare Elliptizität $\Theta_{MRK}[\text{k}^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}]$. Bei der Auswertung der Daten wurde der Mittelwert dieser Messungen errechnet. Falls die eingesetzte Proteinmenge der zu vergleichenden Proteine nicht identisch war, wurde eine nachträgliche Normalisierung der Proteinkonzentration durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und C606

Die Laborstämme *S. pneumoniae* C405 und C606 werden zwei unabhängigen Cefotaxim-resistenten Mutantenfamilien zugeordnet und sind bei der Untersuchung der Resistenzentwicklung unter Laborbedingungen entstanden (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991). Beide Stämme besitzen mehrere AS-Austausche innerhalb der Transpeptidase-Domäne des Penicillin-Bindeproteins 2x, die Cefotaxim-Resistenz vermitteln. Des Weiteren besitzt der Stamm C606 eine 119 bp große Sequenzwiederholung im Gen *pbp2a* (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991). Dieser Repeat führt zu einem frühzeitigen Stopp nach S566 in dem Penicillin-Bindeprotein 2a (Rutschmann, 2011). Zudem weisen beide Stämme je eine Veränderung in der Histidinkinase CiaH des Zweikomponenten Systems CiaRH auf. Beide *ciaH*-Allele führen zu einer Erhöhung der Aktivität der Promotoren der Gene, die durch den Response Regulator CiaR reguliert werden. Im Fall des *ciaH306*-Allels aus C606 konnte eine 11-13fache Erhöhung der Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, wohingegen das *ciaH305*-Allel aus C405 nur einen moderaten 4fachen Anstieg der Aktivität aufwies (Müller *et al.*, 2011). Der Response Regulator CiaR kontrolliert 15 Promotoren direkt, die wiederum die Transkription von 24 Genen steuern (Halfmann *et al.*, 2007b). Eines der Gene, dessen Transkription strikt von CiaR reguliert wird, ist *htrA*, das für die Serinprotease HtrA kodiert (Halfmann *et al.*, 2007b).

3.1.1 Verringerte Menge des essentiellen PBP2x und die Rolle der Serinprotease HtrA

Die Cefotaxim-resistenten Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und C606 besitzen überraschenderweise eine wesentlich geringere Proteinmenge des essentiellen Penicillin-Bindeproteins 2x im Vergleich zum Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009). Diese verringerte Proteinmenge konnte bereits direkt mit der Serinprotease HtrA in Zusammenhang gebracht werden. Hierfür wurde das Gen *htrA* in C405 und C606 durch das Einbringen einer Kanamycin-Resistenzkassette (Kap. 2.7.3.1) deletiert. Western-Blotanalysen zeigen, dass das Fehlen von HtrA den Effekt der verringerten PBP2x-Menge aufhebt (Peters, 2009). Um diese Ausgangsdaten zu verifizieren wurden Western-Blotanalysen der Stämme R6, C405, C606, und der *htrA*-Deletionsderivate KPKL6 und KPKL5 durchgeführt. In Abb. 3.1 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. In den Proben der Laborstämme sind die verringerten PBP2x-Mengen deutlich zu erkennen. Für den Stamm C606 konnte interessanterweise eine noch geringere PBP2x-Menge als in C405 nachgewiesen werden (siehe z.B. Abb. 3.13). Korrelierend dazu zeigten die Stämme C405 und C606 eine erhöhte HtrA-Menge, was sich nicht nur durch eine stärkere HtrA-Proteinbande bei ca. 45 kDa, sondern auch durch die Anwesenheit von Abbaubanden bei ca. 35 kDa auf dem Western-Blot bemerkbar macht. Die erhöhten HtrA-Mengen konnten bereits auf eine erhöhte Transkription des Gens *htrA* zurückgeführt

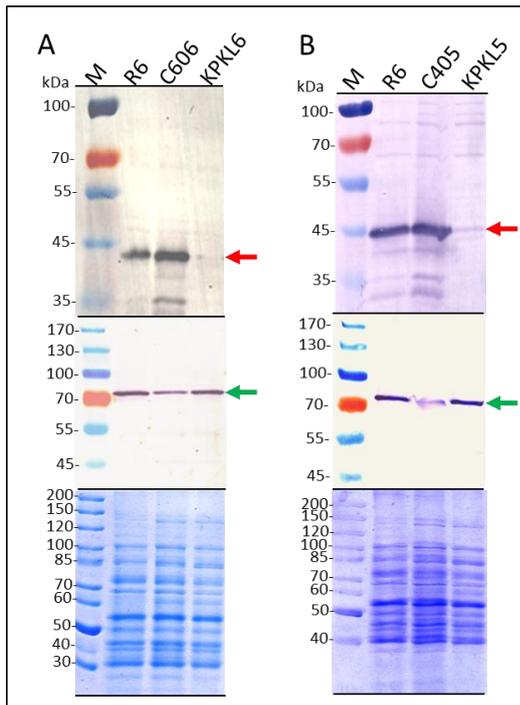


Abb. 3.1: Untersuchung der PBP2x- und HtrA-Mengen in *S. pneumoniae* C405 und C606 in An- und Abwesenheit von HtrA mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiesiegels der Zellysate der C606-Stämme (A) und der C405-Stämme (B) bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL6 (C606 $\Delta htrA$), KPKL5 (C405 $\Delta htrA$). Auf ein 10%iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach einer Auftrennung durch eine 10%ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab). Unten: Zwei weitere 10%ige SDS-Gele wurden ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA (1:1.000) (Sebert *et al.*, 2005) (oben) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca. 45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 80 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

werden (Peters, 2009). In den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL6 und KPKL5 konnte, im Vergleich zu den Laborstämmen, eine erhöhte PBP2x-Menge detektiert werden. Diese Proteinmengen sind mit der PBP2x-Menge im Wildtypstamm R6 vergleichbar. Dies beweist, dass die Anwesenheit der Serinprotease HtrA in diesen Stämmen ausschlaggebend für die verringerten PBP2x-Mengen ist. Anhand dieser Daten und aufgrund der Tatsache, dass eine verringerte mRNA-Menge als Ursache für die erniedrigte PBP2x-Menge in C405 und C606 bereits anhand von quantitativer RT-PCR ausgeschlossen wurde (Peters, 2009), wird ein Abbau der veränderten PBP2x-Proteine durch HtrA stark vermutet.

3.1.1.1 Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von HtrA in den Laborstämmen C405 und C606

Die Serinprotease HtrA ist in Bakterien als bifunktionales Enzym bekannt. Es besitzt neben seiner Proteasefunktion auch eine Chaperonaktivität und kann somit Zellstress verringern, da es in der Lage ist bei hohen Temperaturen als Protease und bei niedrigen als Chaperon zu fungieren (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Spiess *et al.*, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass die proteolytische Aktivität von HtrA in *S. pneumoniae* durch das Einbringen einer Substitution (S234A) im aktiven Zentrum von HtrA ausgeschaltet werden kann, wohingegen die Chaperonaktivität von HtrA erhalten bleibt (Sebert *et al.*, 2005; Cassone *et al.*, 2012).

Der Abbau des essentiellen PBP2x in den Laborstämmen C405 und C606 durch HtrA sollte verifiziert werden. Dafür wurden die HtrA-Deletionsstämmen KPKL1 (R6 $\Delta htrA$), KPKL6 (C606 $\Delta htrA$) und KPKL5 (C405 $\Delta htrA$) mit *htrA*_{S234A} komplementiert, welches zuvor mittels gerichteter Mutagenese erstellt wurde (Kap. 2.7.3.4). Auf diese Weise entstanden die Stämme KPKL14, KPKL61 und

KPKL51. Da bei diesen Stämmen aufgrund der eingeführten Mutation die proteolytische Aktivität fehlt, wurde erwartet, dass die PBP2x-Mengen in den Stämmen KPKL61 und KPKL51 der PBP2x-Proteinmenge in *S. pneumoniae* R6 entsprechen. Um dies zu testen wurden Zellysate bei 37 °C generiert und anschließend mittels Western-Blotanalysen mit polyklonalen Antikörpern α -HtrA (Sebert *et al.*, 2005) und α -PBP2x (Hakenbeck *et al.*, 1991) analysiert. Als Kontrollen der detektierten Proteinmengen dienten die Stämme KPKL1, KPKL6, KPKL5 und die Ausgangsstämme R6, C405 und C606. In Abb. 3.2 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

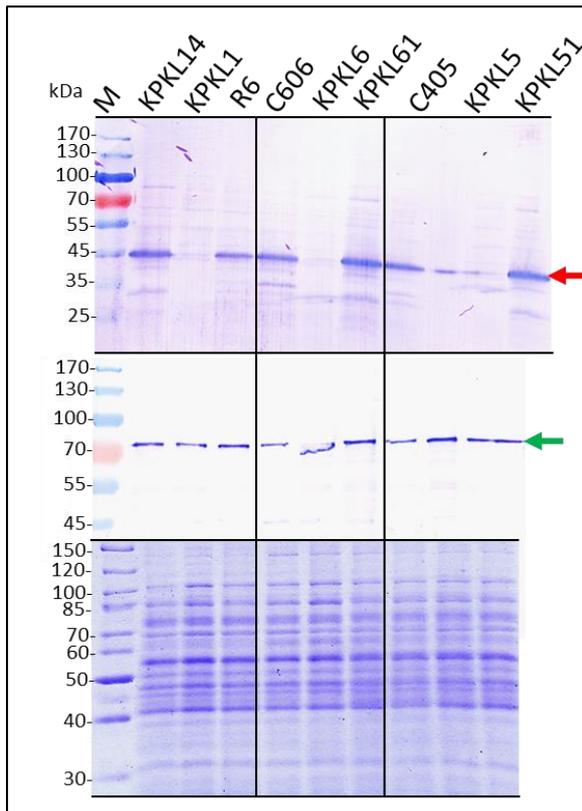


Abb. 3.2: Untersuchung der Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von HtrA mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL1(R6 $\Delta htrA$), KPKL14 (R6 $\Delta htrA htrA_{S234A}$), KPKL6 (C606 $\Delta htrA$), KPKL61 (C606 $\Delta htrA htrA_{S234A}$), KPKL5 (C405 $\Delta htrA$), KPKL51 (C405 $\Delta htrA htrA_{S234A}$). Unten: Auf ein SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der zuvor bei 37 °C hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach der Auftrennung durch eine 10 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab). Oben: Zwei weitere 10 %ige SDS-Gele wurden ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA (Sebert *et al.*, 2005; 1:1.000) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca. 45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 80 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

Die Western-Blotanalysen mit dem α -HtrA-Antikörper beweist eine erfolgreiche Komplementation von HtrA in den Stämmen KPKL14, KPKL61 und KPKL51, da in allen drei Fällen die HtrA-Proteinbande bei ca. 45 kDa detektiert werden konnte. In den Stämmen R6 und KPKL14 zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich ihrer PBP2x-Proteinmengen. Die Deletion wirkt sich demnach im genetischen Hintergrund von R6 nicht auf die PBP2x-Menge aus. Des Weiteren wurde bei den Stämmen *S. pneumoniae* KPKL61 und KPKL51 die gleiche PBP2x-Menge wie der Stamm *S. pneumoniae* R6 nachgewiesen. Im Vergleich zu KPKL6 bzw. KPKL5 zeigte sich eine jeweils erhöhte PBP2x-Menge. Dies bestätigt, dass sowohl in C405, als auch in C606 die Proteaseaktivität von HtrA für die verringerten PBP2x-Mengen verantwortlich ist.

Interessanterweise ist aus Abb. 3.2 ersichtlich, dass bei dem Western-Blot mit dem α -HtrA-Antikörper in der Probe des *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms KPKL14 im Gegensatz zu R6 eine Nebenbande bei ca. 35 kDa detektiert werden konnte. Weiterhin zeigten die Stämme *S. pneumoniae* KPKL51 und

KPKL61 ebenfalls Nebenbanden in der Höhe von 35 kDa, die sich nicht auf der gleichen Höhe befanden, wie die bereits bekannten HtrA-Nebenbanden in C405 und C606, sondern vielmehr etwas kleiner waren. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment mit neu hergestellten Zelllysaten bestätigt.

3.1.2 Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge in der *S. pneumoniae* R6 Zelle

Die Anzahl der PBP2x-Moleküle in der *S. pneumoniae* Zelle spielt bei der Betrachtung der enzymatischen Reaktion dieses essentiellen Enzyms eine entscheidende Rolle. Die Molekülmenge des PBP2x-Proteins pro *S. pneumoniae* Zelle wurde bereits in zwei voneinander unabhängigen Arbeiten bestimmt, wobei stark divergierende Ergebnisse erzielt wurden. Bei Noirclerc-Savoie *et al.*, 2005 wurde anhand der durchgeführten Experimente ein Wert von 260 ± 60 Molekülen PBP2x pro cfu (colony-forming units) berechnet. In einer weiteren Studie wurde dagegen mit einem Wert von 43.475 Molekülen PBP2x pro cfu, was umgerechnet 18.545 Molekülen PBP2x pro Zelle entspricht, ein 167fach höherer Wert ermittelt (Rutschmann, 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass die bisher vorhandenen Daten zur Beantwortung dieser wichtigen Frage sehr unterschiedlich sind, wurde eine erneute Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge für *S. pneumoniae* R6 Zellen mit der quantitativen Methode der ECL vorgenommen.

Hierfür wurden Western-Blotexperimente mit definierte Mengen der Zelllysate von *S. pneumoniae* R6 und C405 durchgeführt. Als Standard dienten Elutionen mit bekannten Konzentrationen des GST-PBP2x-Fusionsproteins, das die lösliche Form des PBP2x-Derivats aus *S. pneumoniae* R6 beinhaltet. Diese wurden in Form einer Eichgerade ebenfalls mittels Western-Blot untersucht (Kap. 2.9.4.1). Nach erfolgtem Experiment wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646; Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit IgG HRP-konjugierten Antikörper (ECL, Thermo Scientific) inkubiert. Zur Detektion wurde das ultra-sensitiven SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) verwendet und die entstandene Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des vollautomatischen Geräts ODYSSEY® Fc (Dual-Mode Imaging System, Li-COR Biosciences) detektiert. Die Bandenintensitäten der einzelnen Proben wurden mit Hilfe der Software LI-COR, Image Studio (Version 2.0) ermittelt.

In der Abb. 3.3 ist die Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge pro *S. pneumoniae* R6 Zelle mittels Western-Blotanalyse mit ECL und das dazugehörige Coomassiesiegel dargestellt. Anhand des Coomassiesiegels sind zum einen die unterschiedlichen aufgetragenen Zelllysatzmengen von R6 und C405 und zum anderen die kontinuierlich abnehmenden Mengen des aufgetragenen GST-PBP2x-Proteinstandards deutlich zu erkennen. Des Weiteren ist anhand der Abb. 3.3 zu erkennen, dass es zu einem Signalabbruch bei den 200 und 100 ng GST-PBP2x kommt, der auch in allen weiteren durchgeführten Experimenten zur Quantifizierung der PBP2x-Menge festgestellt wurde. Der Western-Blot zeigt das detektierte GST-PBP2x_{wf}-Protein bei ca. 100 kDa. Bei den Proben des GST-PBP2x-Proteins,

bei denen 800 ng und 600 ng aufgetragen wurden, wurden zahlreiche zusätzliche Abbaubanden von PBP2x detektiert. Diese Banden wurden bei der darauffolgenden Quantifizierung der Bandenintensität nicht berücksichtigt. In den Zelllysaten wurde das PBP2x-Protein bei ca. 80 kDa nachgewiesen.

Anhand der Software LI-COR, Image Studio (Version 2.0) konnte für die Zelllysate Probe von R6, bei der 8 μ l aufgetragen wurden, eine annähernd gleiche Bandenintensität wie bei der 300 ng Probe des GST-PBP2x_{wt} nachgewiesen werden (kleine rote Pfeile, Abb. 3.3).

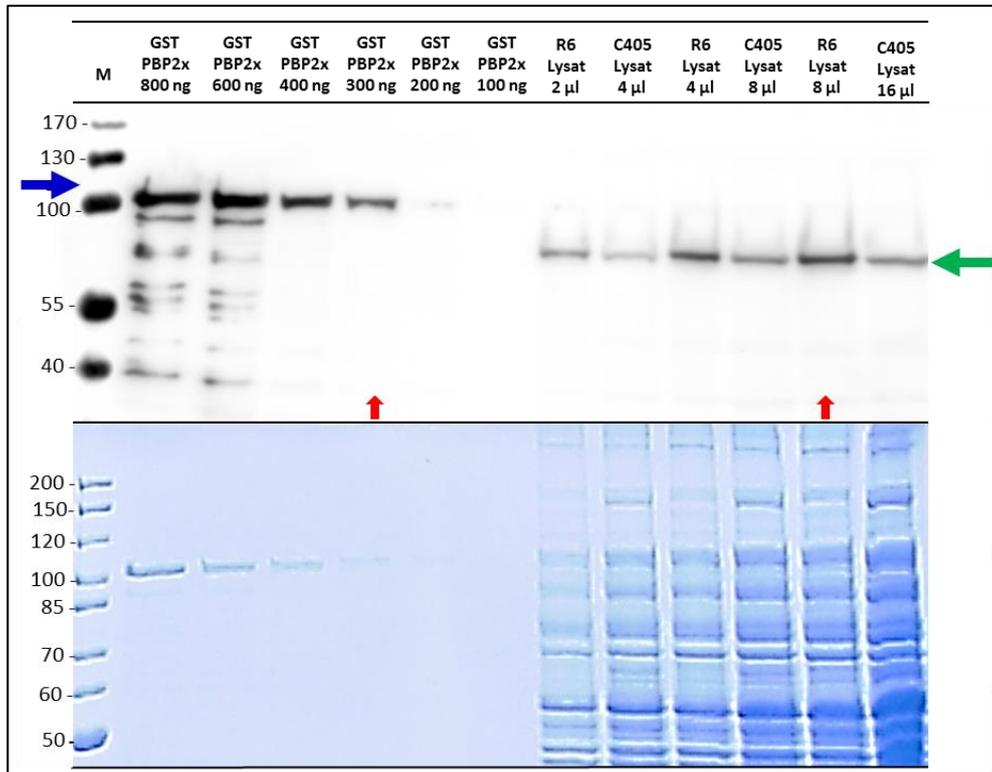


Abb. 3.3: Quantifizierung der PBP2x-Molekülmenge pro *S. pneumoniae* R6 Zelle mittels Western-Blotanalyse mit ECL. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegeles der Zelllysate R6 und C405 bei einer Zelldichte von N_{70} und des aufgereinigten Proteins GST-PBP2x. Auf zwei 10 %ige SDS-Gel wurden die jeweils angegebenen Mengen der Proben aufgetragen. Unten: Nach erfolgter Auftrennung wurde eines der Gele zur Beladungskontrolle mit Coomassie gefärbt. Oben: Die Proteine des zweiten Gels, welches ebenso beladen worden war, wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, Sigma-Aldrich Whatman) mit einer Porengröße von 0,2 μ m transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit IgG HRP-konjugierten Antikörper (ECL, Thermo Scientific, 1:5.000). Zur Detektion wurde das SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Hilfe des vollautomatischen Geräts ODYSSEY® Fc (Dual-Mode Imaging System, Li-COR Biosciences) detektiert. Die Lage des GST-PBP2x_{wt}-Protein ist durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet (ca. 100 kDa). Die detektierten PBP2x-Proteine (ca. 80 kDa) sind durch einen grünen Pfeil markiert. Die beiden kleinen roten Pfeile markieren Proben, für die annähernd die gleiche Bandenintensität bestimmt wurde.

In Abb. 3.4 ist die Auswertung des in Abb. 3.3 dargestellten Western-Blots gezeigt. Die ermittelte Bandenintensität von GST-PBP2x (103,93 kDa) wurden umgerechnet und durch einen Korrekturfaktor die Linkerregion und der GST-Tag dieses Konstrukts abgezogen. Das Molekulargewicht des löslichen PBP2x-Derivats wurde anhand der AS-Sequenz auf 77.520 Da bestimmt. Die auf diese

Weise ermittelten Werte, die einem löslichen PBP2x-Protein entsprechen, wurden gegen die gemessenen PBP2x-Proteinmengen aufgetragen. Die durchgezogene Linie markiert die Regressionsgerade. Demnach entspricht der markierte Punkt, der einer Bandenintensität von 34,4 besitzt, 235,72 ng des löslichen PBP2x-Proteins. Aufgetragen wurden in diesem Fall 8 µl Zellysate des Stamms *S. pneumoniae* R6.

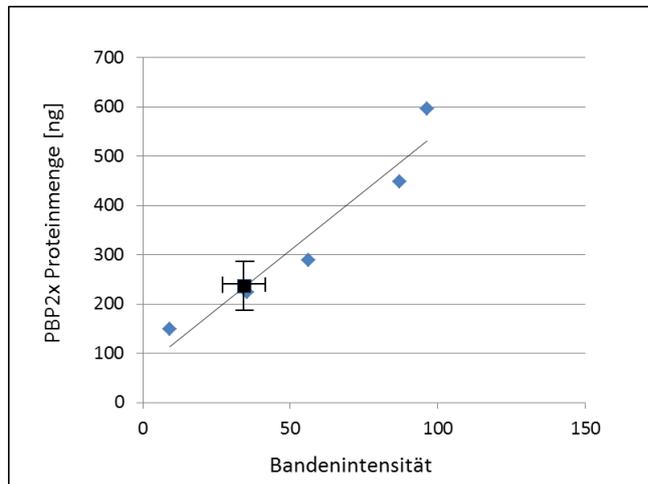


Abb. 3.4: Auswertung des Western-Blots zur Quantifizierung der PBP2x-Moleküle pro Zelle. Die ermittelte Bandenintensität von PBP2x (aus Abb. 3.3) wurden gegen die gemessene PBP2x-Proteinmengen aufgetragen. Die durchgezogene Linie markiert die Regressionsgerade. Der markierte Punkt zeigt eine Bandenintensität von 34,4 und entspricht 235,72 ng PBP2x-Protein. Aufgetragen wurden hierfür 8 µl Zellysate von *S. pneumoniae* R6.

Das Zellysate wurde zuvor folgendermaßen erstellt: 2 ml Kultur mit einer Zelldichte von $N 70$ wurden herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde in 35 µl 20 mM Natriumphosphatpuffer mit Triton X100 aufgenommen und davon 8 µl auf das Gel aufgetragen. Dies wurde in der Berechnung mit berücksichtigt. Demnach wurde eine Menge auf das Gel aufgetragen, die der Menge von 457 µl einer Kultur bei $N 70$ entspricht.

Um einen Vergleich zwischen der Proteinmenge des PBP2x-Derivats zur Zellzahl von *S. pneumoniae* R6 erstellen zu können, wurde die Lebendkeimzahl dieses Stamms bei einer Zelldichte von $N 70$ exakt bestimmt. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden unterschiedliche Verdünnungen des Stamms *S. pneumoniae* R6 mehrfach auf D-Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 24-48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die hieraus erhaltenen Kolonien wurden gezählt. Um die Zellzahl in Flüssigkulturen bestimmen zu können, wurde des Weiteren die Neubauer Zählkammer (Improved, Optik Labor) nach Herstellerangaben verwendet und die Zellen ausgezählt.

Anhand der Auszählung wurden 225.600 Zellen/µl *S. pneumoniae* R6 Probe bestimmt. Die Methode des Ausplattierens lieferte dagegen einen Wert von 176.300 Zellen/µl *S. pneumoniae* R6 Probe. Demnach wurden laut Auszählung 103.099.200 Zellen und laut Ausplattierung 80.569.100 Zellen auf das SDS-Gel aufgetragen. Anhand der ausgezählten Zellen wurde ein Wert von 17.700 PBP2x-Molekülen/Zelle berechnet. Ausgehend von den ausplattierten Zellen ergibt sich ein Wert von 22.650 PBP2x-Moleküle/cfu. Demnach bestätigt die Bestimmung der PBP2x-Menge in *S. pneumoniae* R6 die bisherigen Daten von Rutschman, da sich das Ergebnis im gleichen Größenbereich befindet.

3.1.3 Quantifizierung des Mengenunterschieds von PBP2x in den Stämmen R6 und C405

Die erstaunliche Tatsache, dass die Laborstämme *S. pneumoniae* C405 und C606 trotz deutlich verringerter Menge des essentiellen PBP2x durchaus lebensfähig waren, warf die Frage nach einer Quantifizierung des Mengenunterschieds auf. Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit dem Stamm *S. pneumoniae* C405 weitergearbeitet wurde, sollte der Mengenunterschied an PBP2x zwischen C405 und R6 quantitativ mittels Western-Blotanalysen mit ECL (enhanced chemiluminescence) ermittelt werden (Kap. 2.9.4.1). In Abb. 3.5 ist die Quantifizierung des Proteinmengenunterschieds an PBP2x in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 und C405 mittels ECL dargestellt. In Abb. 3.5 A sind die Ergebnisse einer Western-Blotanalyse und des Coomassiegels zweier unabhängig hergestellter Zelllysate (I und II) von R6 und C405 dargestellt. Zur Detektion wurde das SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) verwendet.

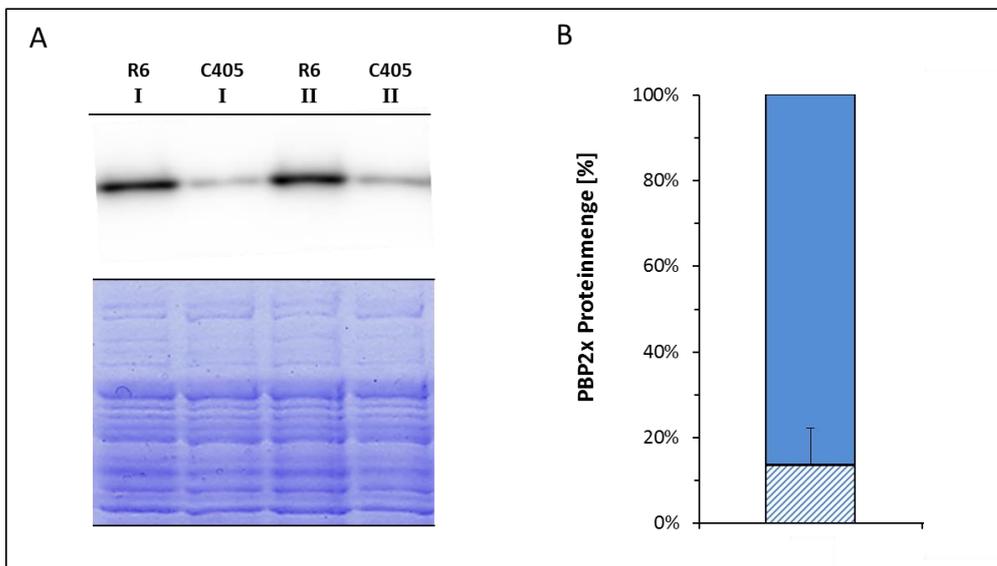


Abb. 3.5: Quantifizierung des Proteinmengenunterschieds an PBP2x in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 und C405 mittels ECL. **A:** Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegels zweier unabhängig hergestellter Zelllysate (I und II) von R6 und C405 bei einer Zelldichte von N 70. Auf zwei 10 %ige SDS-Gel wurden jeweils 4 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde eines der Gele zur Beladungskontrolle mit Coomassie gefärbt (unten). Die Proteine des zweiten Gels wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, Sigma-Aldrich Whatman) mit einer Porengröße von 0,2 μ m transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646; Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit IgG HRP-konjugierten Antikörper (ECL; Thermo Scientific; 1:5.000). Zur Detektion wurde das SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Hilfe des vollautomatischen Geräts ODYSSEY® Fc (Dual-Mode Imaging System, Li-COR Biosciences) detektiert. **B:** Dargestellt sind die Ergebnisse der Quantifizierung der PBP2x-Mengenunterschiede in den Stämmen R6 und C405. Die Mittelwerte der bestimmten Proteinmengen [%] aus fünf unabhängigen Experimenten sind prozentual als farbige Balken dargestellt (blau: PBP2x-Menge in R6, blau-weiß-schraffiert: PBP2x-Menge in C405). Der schwarze Fehlerbalken gibt dabei die Standardabweichung an. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte anhand der Software LI-COR, Image Studio (Version 2.0).

Dieses ECL Substrat diente zur Detektion der Peroxidase-Aktivität des sekundären Antikörpers, der mit HRP (horseradish peroxidase) konjugiert war. Es ist in der Lage auch sehr geringe Femtogramm an Protein zu detektieren. Das Enzym HRP katalysiert die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalate, wobei Chemilumineszenz entsteht, die wiederum mit Hilfe des vollautomatischen Geräts ODYSSEY® Fc (Dual-Mode Imaging System, Li-COR Biosciences) detektiert wurde. In Abb. 3.5 A ist der Proteinmengenunterschied an PBP2x in den beiden Stämmen eindeutig zu sehen. Das Coomassiegel zeigt deutlich, dass identische Zellysatenmengen aufgetragen wurden. Sowohl die Zellysate Isolation I, als auch II zeigen einen ähnlichen Proteinmengenunterschied in den beiden Stämmen. Die Abb. 3.5 B veranschaulicht den PBP2x-Mengenunterschied in den Stämmen R6 und C405 als prozentuale Darstellung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die PBP2x-Proteinmenge in *S. pneumoniae* R6 entspricht in dieser Darstellung 100%. Demnach besitzt der Stamm *S. pneumoniae* C405 mit rund 15,9 % 6,29-mal weniger PBP2x-Proteine als der Wildtypstamms R6.

3.1.4 Veränderte Menge an PBP1a in den Laborstämmen C405 und C606 und eine mögliche

Rolle von HtrA

Im Zuge der Arbeit im Labor sollte die Durchführung von Western-Blots Experimenten optimiert werden. Um eine interne Kontrolle auf dem Western-Blot zu haben wurde im Anschluß an den Western-Blot mit α -PBP2x-Antikörpern eine zusätzliche Detektion mit α -PBP1a-Antikörpern durchgeführt, da keinerlei Veränderungen in den PBP1a-Proteinmengen der untersuchten Stämme erwartet wurden. Überraschenderweise zeigten sich jedoch Unterschiede in der PBP1a-Proteinmenge innerhalb der untersuchten Stämme (Kap. 3.8.1, Abb. 3.37: Western-Blotanalyse mit α -PBP2x- und α -PBP1a-Antikörpern der GFP-Stämme im genetischen Hintergrund von R6_{pbp2xC405}-T6 und C405). Ausschließlich in dem Stamm *S. pneumoniae* C405 und all seinen Derivaten konnte im Gegensatz zu den anderen Stämmen eine erhöhte PBP1a-Menge detektiert werden. Um diesen überraschenden Effekt zu verifizieren, wurde der Western-Blot mit neu hergestellten Zellysaten auf gleiche Art und Weise wiederholt und in *S. pneumoniae* C405 Stamm und all seinen Derivaten wurde eine ca. 2fach erhöhte Menge im Vergleich zu den anderen Stämmen detektiert.

Dieser Befund sollte mit einer weiteren Methode untersucht werden. Hierfür wurden die Penicillin-Bindeproteine in Zellysaten der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 mit Hilfe von Bocillin™ FL, einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat (Zhao *et al.*, 1999) markiert (Kap. 2.9.3). Um mögliche geringe Unterschiede in der β -Laktam-Affinität von PBP1a in den *S. pneumoniae* Stämmen R6, C405 und C606 zu untersuchen, wurden die Zellysate der Stämme mit variierenden Endkonzentration (0,5-5,8 μ M) an Bocillin™ FL auf Eis gemischt und im Anschluss 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proteine der Proben wurden im Anschluss in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse der Markierung der PBPs der Stämme *S. pneumoniae* C405 und C606

im Vergleich zu dem Wildtypstamm R6 mit 3,75 μM BocillinTM FL dargestellt. Bei der Markierung mit den anderen Konzentrationen an Bocillin waren die Ergebnisse weniger deutlich zu erkennen.

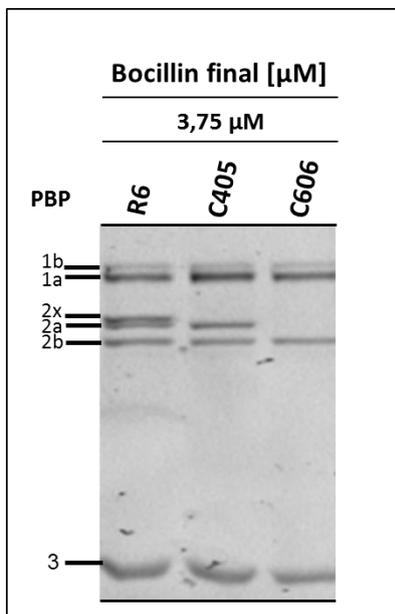


Abb. 3.6: Unterschiede in der β -Laktam-Affinität von PBP1a in den Stämmen *S. pneumoniae* C405 und C606. Dargestellt ist die Markierung der PBPs der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 mit BocillinTMFL (Invitrogen). Die Stämme wurden für die Herstellung der Zellysate bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 70 hochgezogen. Je 5 μl Ly-sat wurden mit 3,75 μM BocillinTM FL (Invitrogen) versetzt, 10 min bei 37 °C inkubiert und nach kurzem Aufkochen mit Laemmli-Probenpuffer (2x) wurden die Proben auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Namen der verschiedenen PBPs sind den einzelnen Banden zugeordnet. Zur Kontrolle der aufgetragenen Probenmengen wurde das Gel im Anschluss mit Coomassie gefärbt (nicht gezeigt).

Die Abb. 3.6 veranschaulicht, dass in dem Stamm R6 alle sechs PBPs deutlich aufgetrennt wurden. Da der Stamm *S. pneumoniae* C405 aufgrund seiner Punktmutationen in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x eine niederaffine Variante von PBP2x besitzt, kann PBP2x nicht detektiert werden. Das gleiche gilt auch für das PBP2x aus C606. Des Weiteren kann PBP2a in dem Zellysate von C606 ebenfalls nicht mit detektiert werden. Dies lässt sich durch die 119 bp große Sequenzwiederholung im Gen *pbp2a* von C606 erklären, die zu einem frühzeitigen Stopp nach S566 in dem Protein führt (Rutschmann, 2011). Sowohl in dem Zellysate von C405, als auch in dem von C606 wurde eine leicht stärkere Bande von PBP1a im Vergleich zum Stamm R6 nachgewiesen.

Im Fall der verringerten PBP2x-Mengen in den Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und *S. pneumoniae* C606, konnte die Serinprotease HtrA für den Abbau des jeweils veränderten PBP2x-Proteins verantwortlich gemacht werden (Peters, 2009). Es sollte getestet werden, ob auch das Penicillin-Bindeprotein 1a in diesen Laborstämmen durch die Serinprotease HtrA abgebaut werden kann, obwohl dieses keine Mutationen aufweist. Daher wurden Western-Blotanalysen der Stämme R6, C405, C606, und der *htrA*-Deletionsderivate KPKL6 und KPKL5 durchgeführt. Die Zellysate dieser Stämme wurden zuvor bei 30 °C und auch bei 37 °C hergestellt. Die PBP1a-Proteine wurden dabei mit Hilfe des primären monoklonalen Antikörper α -PBP1a (301; Hakenbeck *et al.*, 1991; 1:400) detektiert. In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse eines Western-Blotexperiments bei 30 °C dargestellt. Verblüffenderweise konnte innerhalb dieses Experiments eine, im Vergleich zu R6, verringerte PBP1a-Menge in C405 und C606 nachgewiesen werden, was wiederum den bereits beschriebenen Ergebnissen (Abb. 3.6 und Abb. 3.38) widerspricht.

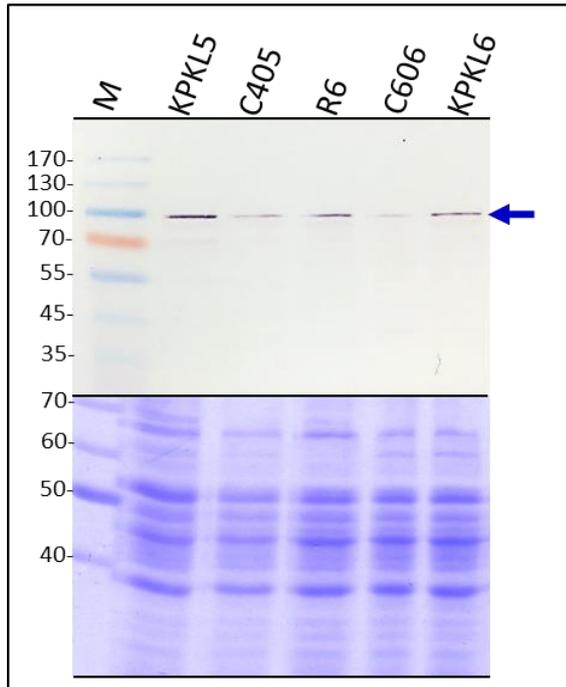


Abb. 3.7: Untersuchung der PBP1a-Mengen in *S. pneumoniae* C405 und C606 in An- und Abwesenheit von HtrA. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zelllysate bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL6 (C606 $\Delta htrA$), KPKL5 (C405 $\Delta htrA$). Unten: Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen und nach der Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab). Oben: Ein weiteres 10 %iges SDS-Gel wurde ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper α -PBP1a (301; Hakenbeck *et al.*, 1991; 1:400) und anschließend mit dem sekundären α -Mouse-Antikörper (Sigma, 1:1.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab) Die detektierten PBP1a-Proteine (ca. 95 kDa, blauer Pfeil) sind markiert.

Die Stämme KPKL5 und KPKL6, in denen das *htrA*-Gen durch das Einbringen einer Kanamycin-Resistenzkassette deletiert wurde, zeigen wiederum eine vergleichbare PBP1a-Menge wie der Stamm *S. pneumoniae* R6. Zwei unabhängige Western-Blotanalysen dieser Stämme bei 37 °C bestätigte dieses Ergebnis. Bei der Wiederholung dieses Experiments mit unabhängigen Zelllysaten bei 30 °C wurden dagegen in allen Stämmen gleiche Mengen an PBP1a detektiert. Da es sich bei den detektierten Unterschieden in allen dargestellten Experimenten zu PBP1a um geringe Unterschiede handelt, sind weitere Experimente nötig um diesen Sachverhalt eindeutig zu klären.

3.1.5 Zusätzliche Proteine in den Labormutanten C405 und C606

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zelllysaten der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 in zahlreichen Western-Blotexperimenten untersucht. Dabei wurden vor jedem durchgeführten Experiment die Proteine der Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe einer Coomassiefärbung detektiert, um eine gleichmäßige Beladung mit den Proben sicherzustellen. Bei der Dokumentation der Experimente fiel auf, dass sowohl in den Zelllysaten der Labormutante C405, als auch in den von C606 zwei zusätzliche Proteinbanden detektiert werden konnten. Die Abb. 3.8 A zeigt die Detektion der zwei zusätzlichen Proteine in den Labormutanten. Eines dieser Proteine hat eine Größe von ca. 130 kDa, während das zweite zusätzliche Protein mit ca. 65 kDa wesentlich kleiner ist. Im Fall von R6 zeigen sich dagegen in diesen Bereichen keine deutlichen Proteinbanden.

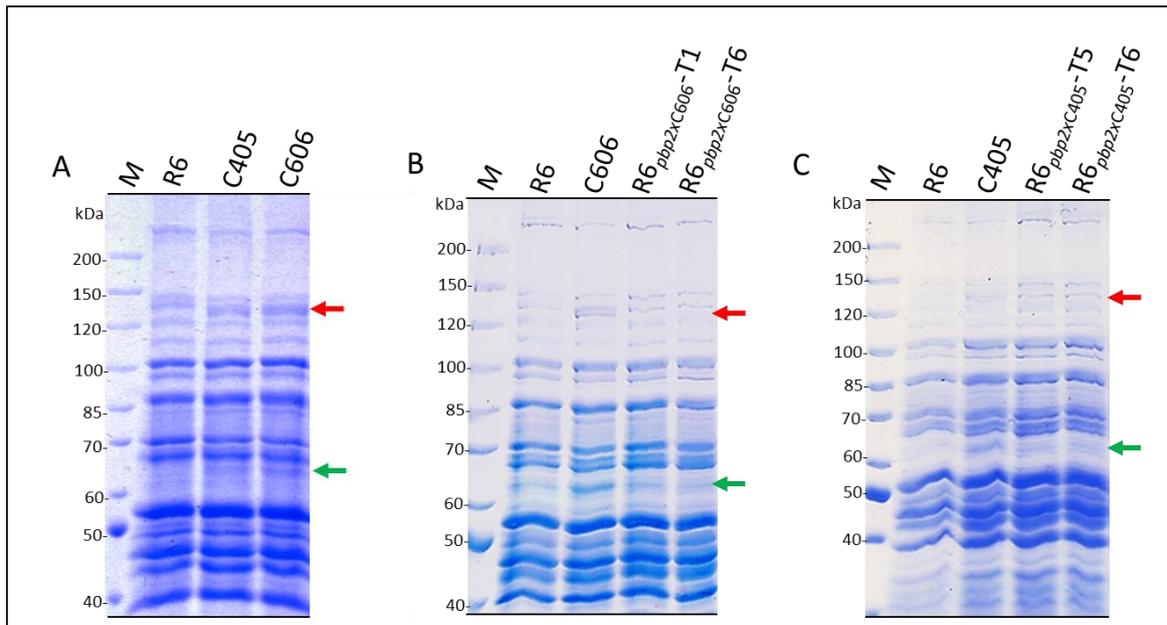


Abb. 3.8: Detektion von zusätzlichen Proteinen in den Stämmen *S. pneumoniae* C405 und C606. Dargestellt sind die Ergebnisse der Coomassiegele unterschiedlicher *S. pneumoniae* Stämme: **A:** R6, C405, C606. **B:** R6_{pbp2xC606}-T1 (R6, PBP2x M289T, G597D, G601V), R6_{pbp2xC606}-T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V). **C:** R6_{pbp2xC405}-T5 (R6, PBP2x L403F), R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S). Die Stämme wurden für die Herstellung der Zellysate bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von N 70 hochgezogen. Auf 7,5 %ige SDS-Gele wurden jeweils 10 µl der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage der zusätzlich nachgewiesenen Proteine wird durch farbige Pfeile gekennzeichnet; rot: ca. 130 kDa, grün: ca. 65 kDa.

Um zu überprüfen, ob diese zusätzlichen Proteine auf die Anwesenheit der jeweiligen PBP2x-Mutationen aus C405 bzw. C606 zurückzuführen waren, wurden Zellysate der Stämme R6_{pbp2xC606}-T1, R6_{pbp2xC606}-T6 (Abb. 3.8 B), R6_{pbp2xC405}-T5 und R6_{pbp2xC405}-T6 (Abb. 3.8 C) ebenfalls untersucht. In den Stämmen R6_{pbp2xC606}-T1 und R6_{pbp2xC606}-T6 zeigten sich im Gegensatz zu C606 keine zusätzlichen Proteine im Zellysate; vielmehr glich das Proteinmuster dem aus R6 (Abb. 3.8 B). Das gleiche Ergebnis zeigten die Stämme R6_{pbp2xC405}-T5 und R6_{pbp2xC405}-T6 (Abb. 3.8 C).

Des Weiteren war es interessant zu testen, ob die detektierten zusätzlichen Proteine in irgendeiner Weise auf das CiaRH-System zurückzuführen sind. Hierfür wurden die Zellysate der Stämme RKL162 und RKL191 untersucht. Der Stamm RKL162 besitzt das *ciaH202*-Allel mit den Punktmutationen G1247A und C706A in *ciaH*, die wiederum zu den AS-Austauschen A413T und Q236K in CiaH-System führen. Das *ciaH202*-Allel führt zu einer 14-15fachen Erhöhung des CiaRH-Systems und geht damit sogar über die Aktivierung des bereits bekannten *ciaH306*-Allels hinaus (Müller *et al.*, 2011). Der Stamm RKL191, der ebenfalls das *ciaH202*-Allel beinhaltet, besitzt ein *ciaR*-Minigen, da die AS 16-204 deletiert wurden. In der Abb. 3.9 ist das Coomassiegel zur Detektion von zusätzlichen Proteinen in *S. pneumoniae* RKL162 und RKL191 gezeigt. In beiden Stämmen konnte weder das große, noch das kleine zusätzliche Protein aus C405 und C606 nachgewiesen werden.

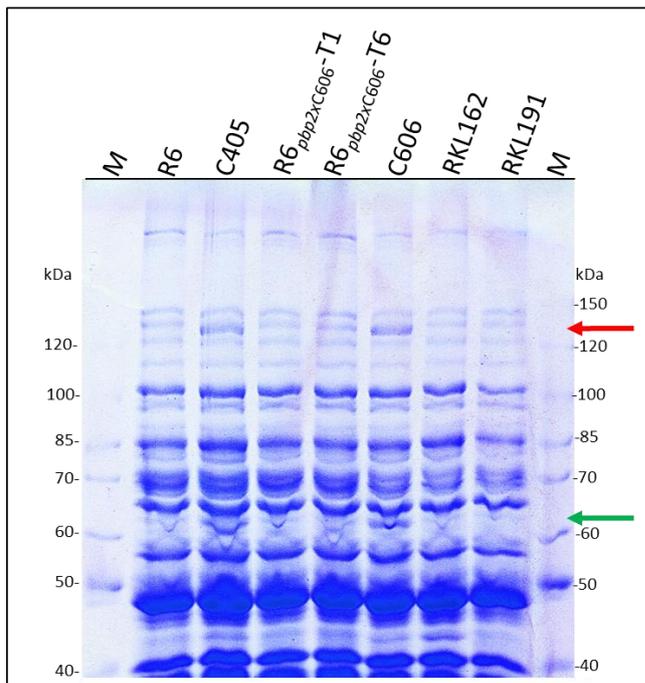


Abb. 3.9: Coomassiegel zur Detektion von zusätzlichen Proteinen in den Stämmen *S. pneumoniae* RKL162 und RKL191. Dargestellt sind die Ergebnisse der Coomassiegele der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405, C606, R6_{pbp2xC606-T1} (R6, PBP2x M289T, G597D, G601V), R6_{pbp2xC606-T6} (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V), RKL162 (R6, *ciaH* Q236K, A413T) und RKL191 (RKL162, *ciaR*-Minigen, Δ AS16-204). Die Stämme wurden für die Herstellung der Zellysate bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von N 70 hochgezogen. Auf 7,5 %ige SDS-Gele wurden jeweils 10 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 5 μ l Proteinmarker II (Peq-Lab). Die Lage der zusätzlich nachgewiesenen Proteine wird durch farbige Pfeile gekennzeichnet; rot: ca. 130 kDa, grün: ca. 65 kDa.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob das Auftreten der zusätzlichen Proteine in C405 und C606 möglicherweise auf eine bestimmte Wachstumstemperatur zurückzuführen ist. Daher wurden von allen Stämmen Zellysate sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C generiert und dahingehend untersucht. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in den Ergebnissen.

3.2 CD-Spektren der unterschiedlichen GST-PBP2x-Fusionskonstrukte

Das Phänomen der deutlich reduzierten Menge des essentiellen PBP2x ging in dem Laborstamm *S. pneumoniae* C405 mit dem Einbringen des AS-Austausches L403F und in C606 mit dem AS-Austausch G422D in dem jeweils veränderten PBP2x einher (Maurer *et al.*, 2008). Daher wurde vermutet, dass offensichtlich neben einer Beeinträchtigung der Affinität zu Penicillin auch die Stabilität dieser veränderten PBP2x-Proteine aufgrund der Mutationen negativ beeinflusst wird (Maurer *et al.*, 2008), was sich wiederum negativ auf die Faltung der Proteine auswirkt.

Die Lokalisation der AS-Austausche in PBP2x aus C405 und C606 wurde sowohl in der dreidimensionalen Struktur des nativen (Pares *et al.*, 1996), als auch innerhalb der Acyl-Enzym Form (Mouz *et al.*, 1999) von PBP2x untersucht und mögliche strukturelle Folgen dieser Veränderungen innerhalb des Proteins theoretisch analysiert (Maurer *et al.*, 2008).

Die Auswirkungen der AS-Austausche der veränderten PBP2x-Proteine aus C405 und C606 wurden im Vergleich zu dem Wildtyp PBP2x-Protein aus *S. pneumoniae* R6 nun praktisch untersucht. Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektrometrie (Kap. 2.11) bietet eine Möglichkeit strukturelle Unterschiede in Proteinen zu untersuchen. Um dies realisieren zu können, wurden lösliche Derivate mit deletierter Membrandomäne der PBP2x-Proteine aus *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 zunächst

als GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie über eine GSH-Sepharose Säule gereinigt (Kap. 2.9.5.1). In Abb. 3.10 ist beispielhaft die Proteinsynthese von GST-PBP2_{x_{wt}} aus *S. pneumoniae* R6 dargestellt. Die Induktion der *E. coli* Zellen erfolgte mit 0,5 mM IPTG über Nacht bei 19 °C.

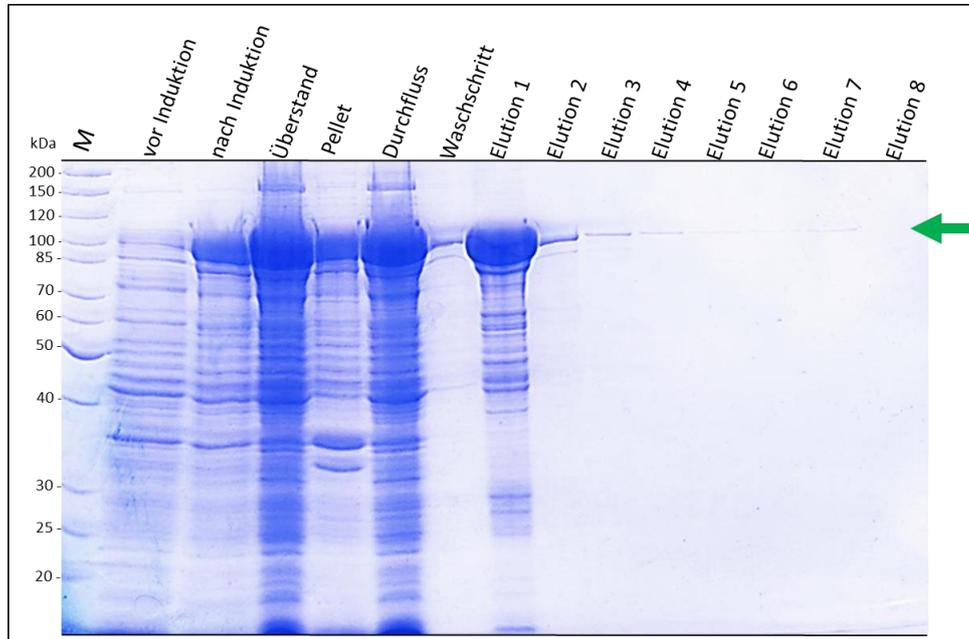


Abb. 3.10: Proteinsynthese von GST-PBP2_{x_{wt}} aus *S. pneumoniae* R6. Dargestellt ist das Ergebnis der Überexpression von GST-PBP2_x mit anschließender Reinigung mittels Affinitätschromatographie über eine Säule mit GSH-Sepharose. Das Gel zeigt Proben vor und nach der Induktion mit 0,5 mM IPTG, sowie des Überstandes und des Pellets nach der Behandlung der Zellen mit Ultraschall. Während der Affinitätsreinigung über GSH-Sepharose wurden Proben des Durchflusses, des Waschschriffs und der acht Elutionsfraktionen entnommen und ebenfalls aufgetragen. Jeweils 10 µl pro Probe wurden aufgetragen und mittels 10 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten GST-PBP2_{x_{wt}}-Proteins ist durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet (ca. 100 kDa).

Anhand des in Abb. 3.10 dargestellten SDS-Gels ist bei der Probe, die nach der Induktion entnommen wurde, eine sehr große GST-PBP2_{x_{wt}}-Proteinmenge bei ca. 100 kDa zu erkennen. Dies zeigt deutlich eine erfolgreiche Proteinexpression nach der Induktion an. Das lösliche Protein liegt sowohl im Überstand, im Durchfluss und in der Elution 1 in sehr großen Mengen vor. Zusätzlich zu der GST-PBP2_{x_{wt}}-Bande sind zahlreiche kleinere Proteinbanden zu sehen, bei denen es sich möglicherweise um Abbauprodukte des Proteins handelt. Die Elution 1 enthält sehr viel Protein, während in den folgenden Elutionen immer geringere Mengen an Protein von der Säule gelöst werden konnten.

Die Proteine GST-PBP2_{x_{C405}} und GST-PBP2_{x_{C606}} lieferten ähnlich große Ausbeute an überexprimiertem Protein (Daten nicht gezeigt). Es erfolgte eine Umpufferung der isolierten Fusionsproteine in 20 mM Natriumphosphatpuffer, der für die anschließenden spektrometrische Messungen geeignet war (Kap. 2.9.5.3). Die Abb. 3.11 zeigt die Ergebnisse. Die drei überexprimierten GST-Fusionsproteine sind bei ca. 100 kDa deutlich zu sehen. Zusätzlich zeigen sich schwächere Abbaubanden in allen drei Fällen. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen, wurden die Konzentrationen der GST-PBP2_x-

Proteine mittels Nanodrop, mittels Bradford-Assay und mittels UV/VIS Messung bestimmt. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde auf 10 μM eingestellt.

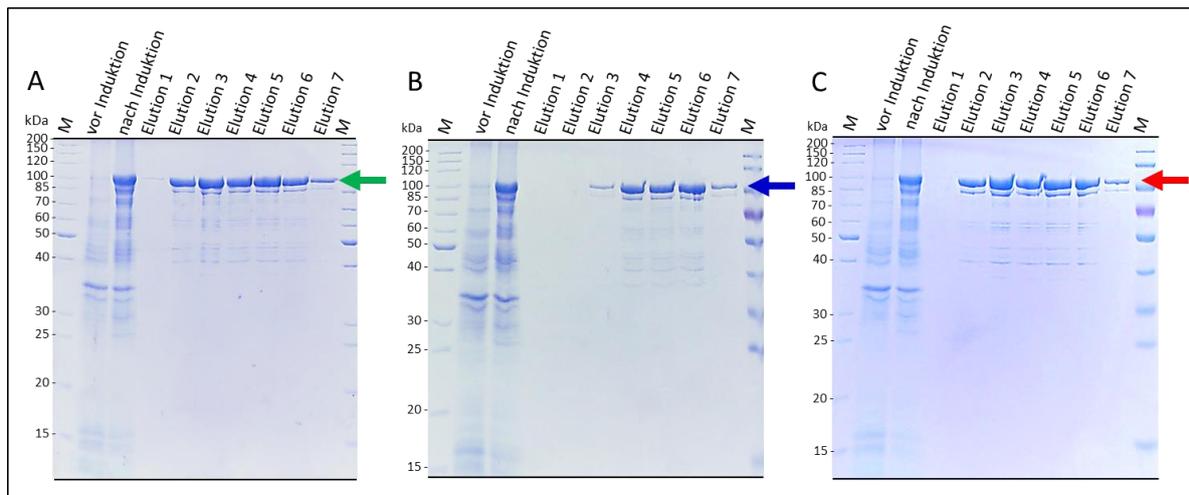


Abb. 3.11: Umpufferung und Entsalzung der GST-PBP2x-Proteine über PD-10 Säulen. Dargestellt sind jeweils sieben Elutionsfraktionen nach der Umpufferung der GST-PBP2x-Fusionsproteine mittels PD-10 Säulen in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2. Zur Kontrolle sind die Proben vor und nach der Induktion ebenfalls gezeigt. **A:** Umpufferung von GST-PBP2_{x_{wt}}. **B:** GST-PBP2_{x_{C405}}, **C:** GST-PBP2_{x_{C606}}. Jeweils 10 μl pro Probe wurden aufgetragen und mittels 10 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 μl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten GST-PBP2_{x_{wt}}- Proteins ist durch farbige Pfeile gekennzeichnet (ca. 100 kDa, grün: GST-PBP2_{x_{wt}}, blau: GST-PBP2_{x_{C405}}, rot: GST-PBP2_{x_{C606}}).

Im Anschluss wurden die Zirkulardichroismus-Spektren von GST-PBP2x aus *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 bei 20 °C, der Standardtemperatur für dieses Experiment ermittelt. Die Messungen wurden zusätzlich sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C durchgeführt, da es für jeweils einen AS-Austausch im PBP2x aus C606 bzw. aus C405 Hinweise auf eine Temperatursensitivität gibt. Im Fall des G422D Austausches ist bekannt, dass dieser bei 37 °C eine sogenannte Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim vermittelt; d.h bei einer Inkubation bei 37 °C wird eine wesentlich geringere MHK erreicht, als bei der Inkubation bei 30 °C (Krauß *et al.*, 1996; Zerfaß, 2010). Für den L304F-Austausch zeigte sich bei der Labormutante C405 ebenfalls laut Krauß *et al.*, 1996 diese Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C, die die MHK bei 30 °C sinken lässt.

In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse der Zirkulardichroismus-Spektren der GST-PBP2x aus *S. pneumoniae* R6, C405 und C606, die bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelt wurden, zu sehen. Alle drei untersuchten GST-PBP2x-Fusionsproteine weisen sowohl bei 20 °C, bei 30 °C, als auch bei 37 °C, identische CD-Spektren auf. Die erhaltenen CD-Spektren zeigen die Form gefaltener, überwiegend α -helikaler Proteine an. Typische α -Helix-Proteine sind an einem positiven Maximum bei 193 nm und an zwei negativen Maxima bei 222 nm und 208 nm zu erkennen (Holzwarth und Doty, 1965). Somit konnten mit dieser Methode weder strukturelle Unterschiede nachgewiesen werden, die auf die einzelnen AS-Austausche zurückzuführen sind, noch strukturelle Unterschiede innerhalb der GST-PBP2x-Proteine, die sich aufgrund einer bestimmte Temperatur ergeben.

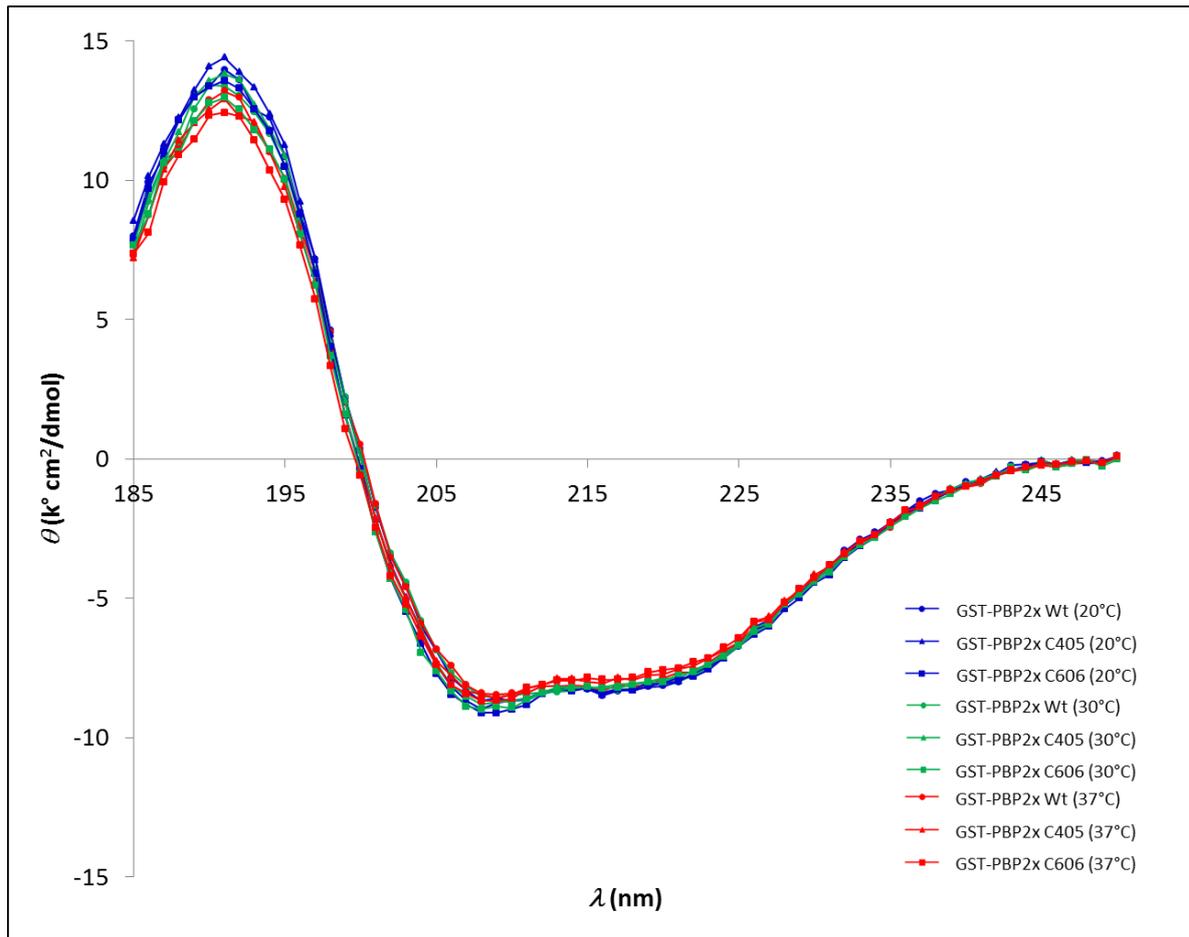


Abb. 3.12: Zirkulardichroismus-Spektren von GST-PBP2x aus *S. pneumoniae* R6, C405 und C606 bei unterschiedlichen Temperaturen. Die zu untersuchenden Proteine GST-PBP2_{wt} (Kreis), GST-PBP2_{C405} (Dreieck), GST-PBP2_{C606} (Quadrat) lagen in einer 10 μ M Proteinlösung vor. Die CD-Messungen wurden im Zirkulardichroismus-Spektrometer Chirascan plus (Applied Photophysics) bei den Temperaturen 20 °C (blau), 30 °C (grün) und 37 °C (rot) durchgeführt. Die CD-Spektren der Proben wurden in einem Wellenlängenbereich von 180-260 nm bei einer Schrittgröße von 1 nm und einer Bandbreite von 1 nm ermittelt (Kap. 2.11).

3.3 Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme mit PBP2x-Mutationen aus C405 und C606 im genetischen Hintergrund von R6

Die erwartete veränderte Faltung der veränderten PBP2x-Proteine konnte zwar mittels Zirkulardichroismus nicht bestätigt werden, wurde aber dennoch vermutet. Daher sollte mit Hilfe eines weiteren Experiments untersucht werden, ob sich die AS-Austausche in der Transpeptidase-Domäne des PBP2x unabhängig von anderen Veränderungen negativ auf die Faltung der Proteine auswirken und somit einen Abbau durch die Serinprotease HtrA begünstigen.

Die PBP2x-Mutationen aus *S. pneumoniae* C405 und C606 wurden bereits einzeln in den genetischen Hintergrund des β -Laktam-sensitiven *S. pneumoniae* R6 gebracht und die erhaltenen Transformanten mit den jeweils niederaffinen PBP2x eingehend charakterisiert (Laible und Hakenbeck, 1991; Koch, 2006; Maurer *et al.*, 2008). Da diese Stämme nur definierte Mutationen in *pbp2x* besitzen, war es von Interesse die PBP2x-Mengen in diesen Stämmen zu analysieren. Western-Blot Experimente mit dem polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper zeigten, dass sich bei den Transformanten mit

dem jeweils veränderten PBP2x keine, im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6, verringerte PBP2x-Mengen nachweisen liesen (Maurer, persönliche Mitteilung). Um diese Daten zu verifizieren, wurden weitere Western-Blotanalysen mit den Zelllysaten der Stämme $R6_{pbp2xC405-T5}$, $R6_{pbp2xC405-T6}$, $R6_{pbp2xC606-T1}$ und $R6_{pbp2xC606-T6}$ durchgeführt, die jeweils eine unterschiedliche Zusammensetzung an den jeweiligen AS-Austauschen in PBP2x beinhalten. Laut theoretischer Vorhersage wirken sich die PBP2x-Mutationen unterschiedlich stark auf die Stabilität aus. Die verwendeten Stämme wurden gezielt für diese Experimente ausgewählt, um eine bestimmte Veränderung für den Verlust der Stabilität verantwortlich machen zu können. Als Kontrolle der detektierten PBP2x-Mengen dienten dabei die Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und C606. In Abb. 3.13 ist ein Beispiel für die Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme mit PBP2x-Mutationen aus C405 oder C606 im genetischen Hintergrund von R6 mittels Western-Blotanalysen dargestellt.

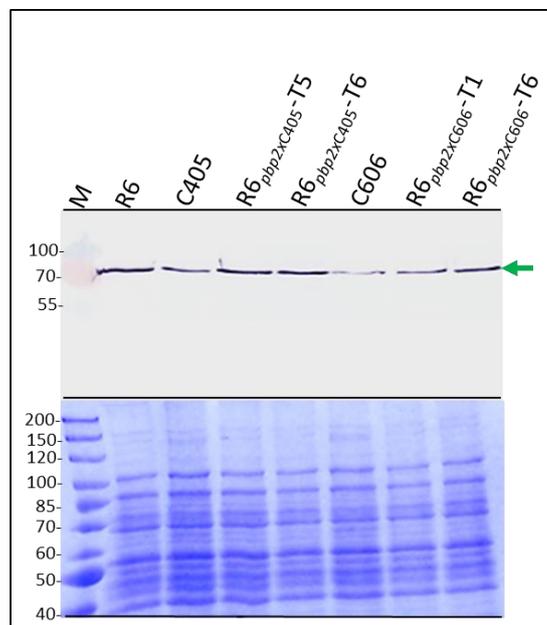


Abb. 3.13: Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme mit PBP2x-Mutationen aus C405 oder C606 im genetischen Hintergrund von R6 mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegefärbtes der Zelllysate bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. $R6_{pbp2xC405-T5}$ (R6, PBP2x L403F), $R6_{pbp2xC405-T6}$ (R6, PBP2x L403F, T526S), $R6_{pbp2xC606-T1}$ (R6, PBP2x M289T, G597D, G601V) und $R6_{pbp2xC606-T6}$ (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V). Unten: Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 2,5 μ l der bei 37 °C hergestellten Zelllysate aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab). Oben: Ein weiteres 10 %iges SDS-Gel wurde ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). Die detektierten PBP2x-Proteine (ca. 80 kDa, grüner Pfeil) sind markiert.

Wie erwartet zeigte das Experiment bei den Stämmen *S. pneumoniae* C405 und vor allem bei C606 im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 deutlich verringerte PBP2x-Mengen. Dem in Abb. 3.13 dargestellten Western-Blot nach zuzufolge, besitzen die Stämme $R6_{pbp2xC405-T5}$ und $R6_{pbp2xC405-T6}$ eine mit R6 vergleichbare PBP2x-Menge. Die Stämme $R6_{pbp2xC606-T6}$ und vor allem $R6_{pbp2xC606-T1}$ zeigten dagegen detektierte PBP2x-Mengen, die im Vergleich zu C606 erhöht sind, allerdings das Niveau in R6 nicht

erreichen. Die bereits vorhandenen Daten hinsichtlich der PBP2x-Mengen konnten somit nur bedingt bestätigt werden. Diese Experimente verdeutlichten vielmehr, dass im Fall von $R6_{pbp2xC606}$ -T6 und $R6_{pbp2xC606}$ -T1 tatsächlich eine verringerte Menge an PBP2x im Vergleich zu R6 vorlag. Da die zu detektierenden Unterschiede klein sind und die Stämme $R6_{pbp2xC405}$ -T6 und $R6_{pbp2xC606}$ -T6 in weiteren Versuchen als Ausgangsstämme dienten, wurden die Western-Blotanalysen unter optimierten Bedingungen wiederholt. Es wurden geringere Zellysatsmengen aufgetragen und die Detektionsreaktion zusätzlich früher abgestoppt. Die Abb. 3.14 zeigt die Ergebnisse.

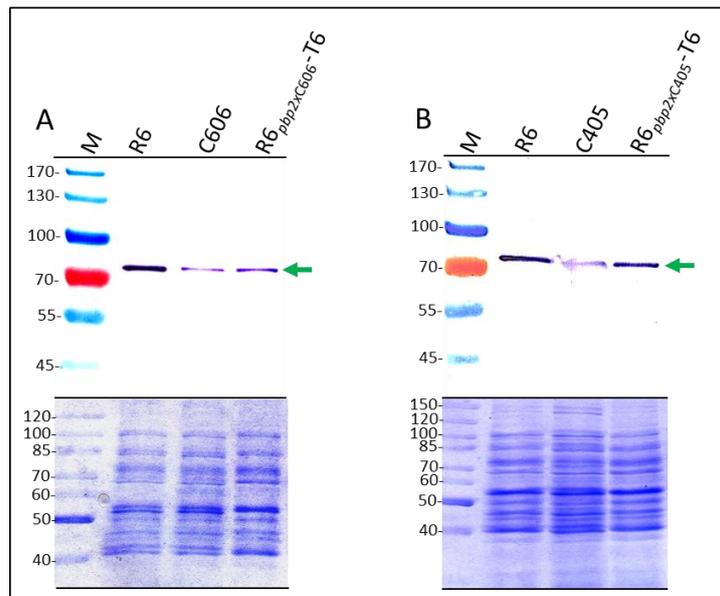


Abb. 3.14: Untersuchung der PBP2x-Mengen der Stämme $R6_{pbp2xC405}$ -T6 und $R6_{pbp2xC606}$ -T6 mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegefärbten Zellysates bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. $R6_{pbp2xC405}$ -T6 (R6, PBP2x L403F, T526S) und $R6_{pbp2xC606}$ -T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V). Unten: Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der bei 37 °C hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab). Ein weiteres 10 %iges SDS-Gel wurde ebenso beladen. Oben: Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646; Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten PBP2x-Proteine (ca. 80 kDa, grüner Pfeil) sind markiert.

Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte, wie aus Abb. 3.14 deutlich wird, in den Stämmen $R6_{pbp2xC405}$ -T6 und vor allem für $R6_{pbp2xC606}$ -T6 eine geringere PBP2x-Menge als in R6 nachgewiesen werden. Der Stamm C606 zeigt eine noch geringere Menge an PBP2x als $R6_{pbp2xC606}$ -T6 und auch bei C405 wurde eine geringere Menge PBP2x detektiert, als in $R6_{pbp2xC405}$ -T6.

Daraus lässt sich schließen, dass sowohl in $R6_{pbp2xC405}$ -T6, als auch $R6_{pbp2xC606}$ -T6 das jeweils veränderte PBP2x-Protein durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird, allerdings nicht in dem Maße wie in den Laborstämmen C405 und C606. Somit wirken sich die Mutationen im Gen *pbp2x* und die mit ihnen einhergehenden Veränderungen in den PBP2x-Proteinen aus C405 und C606 bereits negativ auf die jeweilige PBP2x-Menge aus. Dabei wirken sich die vier AS-Austausche innerhalb der Transp-

tidase-Domäne von PBP2x in dem Stamm $R6_{pbp2xC606}$ -T6 stärker negativ auf die Proteinmenge aus, als die zwei Veränderungen in PBP2x, die der Stamm $R6_{pbp2xC405}$ -T6 aufweist. Diese Daten verdeutlichen jedoch auch, dass die Veränderungen innerhalb von PBP2x nicht der einzige Grund für die geringere PBP2x-Menge in den Labormutanten *S. pneumoniae* C405 und *S. pneumoniae* C606 sind.

3.4 Wachstumsanalysen der Ausgangsstämme und Unterschiede in der Morphologie

Das Wachstumsverhalten der Laborstämme C405, C606 und der vier Stämme mit definierten AS-Austauschen aus C405 und C606 in PBP2x: $R6_{pbp2xC606}$ -T1, $R6_{pbp2xC606}$ -T6, $R6_{pbp2xC405}$ -T5 und $R6_{pbp2xC405}$ -T6 wurde sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C untersucht (Kap. 2.6.3). Zuvor wurde der genetisch korrekte Hintergrund dieser Stämme mittels Sequenzierung der Gene *pbp2x* und *ciaH* überprüft. In Abb. 3.15 A-D sind die ermittelten Ergebnisse der Wachstumsanalysen halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Tab. 3.1 zeigt die ermittelten Generationszeiten der untersuchten Stämme.

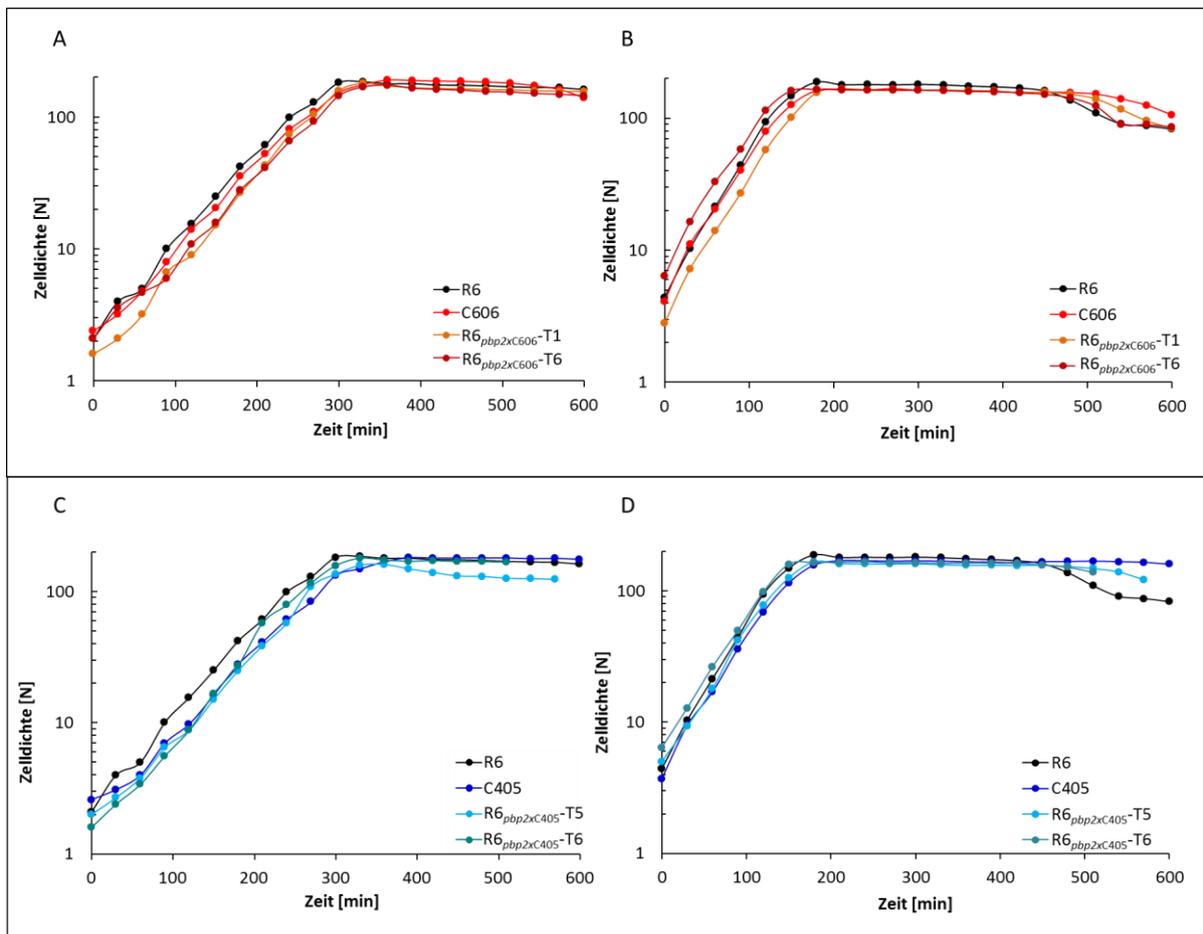


Abb. 3.15: Wachstumsanalysen der Ausgangsstämme bei 30 °C und bei 37 °C. Dargestellt ist das Wachstumsverhalten der Stämme *S. pneumoniae* C606, R6_{pbp2xC606}-T1 (R6, PBP2x M289T, G597D, G601V), R6_{pbp2xC606}-T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V), C405, R6_{pbp2xC405}-T5 (R6, PBP2x L403F), R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S) und des Kontrollstamms *S. pneumoniae* R6 sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C. In **A** und **C** ist das Wachstumsverhalten der angegebenen Stämme bei 30 °C gezeigt, während in **B** und **D** das Wachstumsverhalten bei 37 °C dargestellt ist. Die Stämme wurden in einer Vorkultur bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen und anschließend in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium angeimpft und bei 30 °C bzw. 37 °C weiter inkubiert. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. In der Abbildung wurde die Zelldichte halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Tab. 3.1: Generationszeiten der Ausgangsstämme bei 30 °C und bei 37 °C.

Stamm	g* [min] bei 30 °C	g* [min] bei 37 °C
R6	45	28
C606	46	34
R6_{pbp2xC606}-T1	46	31
R6_{pbp2xC606}-T6	47	32
C405	47	33
R6_{pbp2xC405}-T5	42	32
R6_{pbp2xC405}-T6	43	32

*g: Generationszeit: Die Generationszeit wurde anhand der in Abb. 3.16 dargestellten Wachstumskurven rechnerisch ermittelt.

Anhand der Abb. 3.15 A und C ist das Wachstum des Referenzstammes *S. pneumoniae* R6 bei 30 °C zu erkennen. Der Wildtypstamm wächst dabei mit einer Generationszeit von 45 min; erreicht nach ca. 300 min seine maximale Zelldichte von ca. 180 N und bleibt über den weiteren, gemessenen Zeitraum von 5 h stationär. Alle anderen untersuchten Stämme, bis auf R6_{pbp2xC405}-T5, zeigen bei 30 °C keine deutlichen Unterschiede zu dem Wildtypstamm. Die ermittelten Generationszeiten stimmen mit leichten Schwankungen mit der Generationszeit von R6 überein.

Der Stamm R6_{pbp2xC405}-T5 weist mit 42 min die schnellste Generationszeit aller Stämme auf. Des Weiteren erreicht dieser Stamm bei 30 °C eine deutlich geringere Zelldichte, als alle anderen Stämme.

R6_{pbp2xC405}-T5 enthält im Vergleich zu R6 den L403F-Austausch im PBP2x, der somit für das schnellere Wachstum und die geringere Zelldichte verantwortlich gemacht werden kann. Der Stamm R6_{pbp2xC405}-T6 verfügt neben L403F auch über den T526S-Austausch in PBP2x. Kennzeichnend für das Wachstum dieses Stamms bei 30 °C ist eine Generationszeit von 43 min und eine im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T5 deutlich erhöhte Zelldichte. Demnach scheint der AS-Austausch T526S in PBP2x sich kompensatorisch auszuwirken.

Anhand der Abb. 3.15 B und D ist das Wachstum des Referenzstammes *S. pneumoniae* R6 bei 37 °C zu erkennen. Der Wildtypstamm wächst mit einer Generationszeit von 28 min; er erreicht nach ca. 180 min seine maximale Zelldichte von 188 N. Nach 5 h zeigt sich eine deutliche Lyse.

Das Wachstum des hier untersuchten Laborstamms C606 zeichnet sich bei 37 °C durch eine im Vergleich zu R6 längere Generationszeit von 34 min aus (Tab. 3.1). Zusätzlich wies dieser Stamm bei 37 °C eine stationäre Phase auf, die um 2 h verlängert war. Dieses Wachstumsverhalten von C606 mit einer verlängerten stationären Phase bei 37 °C wurde bereits in einer anderen Studie nachgewiesen

(Peters, 2009). Bei Zerfaß, 2010 zeigte sich für diesen Stamm eine im Vergleich zu R6 verlängerte Generationszeit. Des Weiteren wurde in diesem Fall für C606 ebenfalls eine verringerte maximale Zelldichte und eine deutlich verkürzte stationäre Phase von 1 h nachgewiesen (Zerfaß, 2010).

Der Stamm R6_{pbp2xC606}-T6 beinhaltet alle vier AS-Austausche in PBP2x aus C606 und wächst bei 37 °C mit einer Generationszeit von 32 min. Damit wächst der Stamm zwar langsamer als R6, allerdings auch schneller als C606. Die Länge der stationären Phase dieses Stammes ist im Vergleich zu R6 leicht verlängert, jedoch im Vergleich zu C606 eindeutig verkürzt. Der Stamm R6_{pbp2xC606}-T1, dem der G422D-Austausch aus C606 fehlt, zeigt mit einer Generationszeit von 31 min bei 37 °C ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der bereits beschriebene Stamm R6_{pbp2xC606}-T6.

Der Laborstamm C405 weist bei 37 °C eine im Vergleich zu R6 deutlich verlängerte stationäre Wachstumsphase auf, da der Stamm nach 600 min noch nicht lysiert. Des Weiteren zeigt sich eine im Vergleich zu R6 verlängerte Generationszeit von 33 min. Die Stämme R6_{pbp2xC405}-T5 und R6_{pbp2xC405}-T6 sind beim Wachstum bei 37 °C durch eine im Vergleich zu R6 etwas verlängerte stationäre Phase und durch eine Generationszeit von 32 min gekennzeichnet.

Zusätzlich zu den Wachstumsanalysen der Stämme wurden diese mit Hilfe des Mikroskops untersucht, um zum einen die Stämme auf morphologische Veränderungen hin zu untersuchen und zum anderen, um Kontaminationen auszuschließen (Kap. 2.6.4.1). Bei der Auswertung dieser mikroskopischen Aufnahmen wurden Unterschiede in den Zellgrößen und den Morphologien der Zellen von *S. pneumoniae* R6, C405 und R6_{pbp2xC405}-T6 festgestellt. So wirkten die Zellen des Laborstammes C405 bei 30 °C im Vergleich zum Wildtypstamm R6 kleiner und runder. Der Stamm R6_{pbp2xC405}-T6 zeigte dagegen bei Inkubation bei 30 °C eine deutliche morphologische Veränderung und eine Verlängerung der Zellen im Vergleich zu R6. Um diese Hinweise experimentell zu bestätigen, wurden die Zellgrößen dieser drei Stämme mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2) gemessen, statistisch ausgewertet und verglichen. Gemessen wurden dabei ausschließlich Bakterienzellen, die sich bereits in der fortgeschrittenen Phase des Zellzyklus befanden und eine deutliche Einschnürung der Zelle am Septum besaßen. Somit wurde sichergestellt, dass sich alle analysierten Zellen ca. im gleichen Entwicklungsstadium befanden.

Die Abb. 3.16 zeigt den Vergleich der Zellgröße und der Morphologie der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und R6_{pbp2xC405}-T6. Für die Auswertung in Abb. 3.16 A wurden die Zellen zuvor bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase (N 100-120) bei 30 °C angezogen, wohingegen die Zellen in Abb. 3.16 B sich bereits in der stationären Wachstumsphase (N 150) befanden. In Abb. 3.16 C sind pro Stamm jeweils drei repräsentative mikroskopische Aufnahme gezeigt.

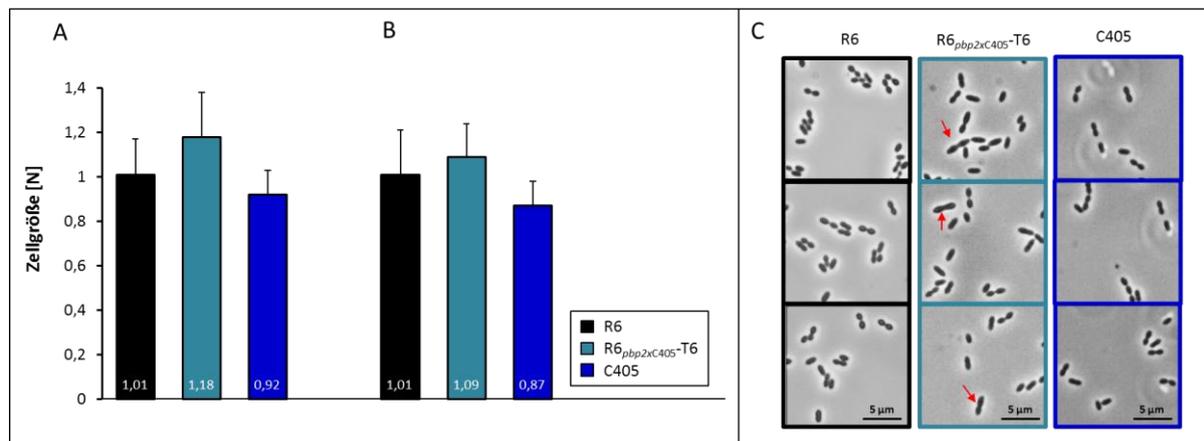


Abb. 3.16: Vergleich der Zellgröße und der Morphologie der Stämme *S. pneumoniae* R6, C405 und R6_{pbp2xC405-T6}. **A und B:** Dargestellt sind die Unterschiede in den Zellgrößen der untersuchten Stämme. Die Namen der Stämme sind der Abbildung zu entnehmen: R6_{pbp2xC405-T6}. Es wurden ausschließlich die Zellgrößen von Bakterienzellen gemessen, die sich bereits in der fortgeschrittenen Zellteilung befanden, da eine deutliche Einschnürung der Zelle am Septum zu erkennen war. Die Größen der Bakterienzellen sind in μm angegeben und wurden mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2) gemessen. Die Stämme wurden zuvor in C-Medium bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer Zelldichte von N 100-120, entspricht der späten exponentiellen Wachstumsphase (**A**) bzw. N 150, entspricht der exponentiellen Wachstumsphase (**B**) inkubiert. Die angegebenen Mittelwerte der ermittelten Zellgrößen stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und sind als farbige Balken dargestellt. Dabei geben schwarze Fehlerbalken die Standardabweichungen und die Zahlen an der Basis der Balken die gerundeten Mittelwerte an. **C:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* C405 und R6_{pbp2xC405-T6} im Vergleich zu R6 bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro Stamm sind jeweils drei mikroskopische Aufnahme gezeigt. Der Maßstab ($5\text{ }\mu\text{m}$) ist unten rechts dargestellt. Rote Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen eine deutliche Vergrößerung bereits mit dem Auge zu erkennen ist.

Für die Zellen des Wildtypstamms *S. pneumoniae* R6 wurde bei beiden untersuchten Zelldichten eine durchschnittliche Zellgröße von $1,01 \pm 0,2\text{ }\mu\text{m}$ ermittelt. Dies zeigt an, dass die Bakterienzellen des Wildtypstamms sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Wachstumsphase die gleichen Zelllängen aufweisen.

Die Zellen des Stamms *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405-T6} der Zelldichte N 100-120 sind gekennzeichnet durch eine durchschnittliche Zellgröße von $1,18 \pm 0,2\text{ }\mu\text{m}$. Damit sind sie im Vergleich zu R6 eindeutig größer. Auch für die R6_{pbp2xC405-T6} Zellen der Dichte N 100-120 konnten durchschnittlich verlängerte Zellen von $1,09 \pm 0,15\text{ }\mu\text{m}$ nachgewiesen werden. Dies beweist, dass die Bakterienzellen von R6_{pbp2xC405-T6} in beiden Wachstumsphasen im Vergleich zu R6 verlängert sind, auch wenn der Effekt in der späten exponentiellen Wachstumsphase (100-120 N) deutlicher wird.

Die Entwicklung der verlängerten, morphologisch auffälligen Zellen im Stamm R6_{pbp2xC405-T6} bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist auf das veränderte PBP2x aus C405 und somit auf die AS-Austausche L403F und T526S im PBP2x zurückzuführen. Dies stimmt mit der zuvor ermittelten Tatsache überein, dass bei diesem Stamm die Lyse früher eintritt. Somit wirken sich die beiden Veränderungen in PBP2x sowohl auf das Wachstumsverhalten, als auch auf die Morphologie und die Zelllänge des Stammes aus.

Der Stamm C405 weist bei beiden untersuchten Zelldichten eine im Vergleich zu R6 verkürzte durchschnittliche Zelllänge auf. Besonders zu Beginn der stationären Wachstumsphase (N 150) weist dieser

Stamm mit einer durchschnittlichen Zelllänge von $0,87 \pm 0,11 \mu\text{m}$ eine deutliche Verkürzung im Vergleich zu R6 auf.

Der Stamm C405 besitzt zusätzlich zu den bereits erwähnten AS-Austauschen in PBP2x auch das *ciaH306*-Allel, welches eine ca. 5fache Erhöhung der Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität von P_{htrA} im Vergleich zum Wildtyp bewirkt (Müller *et al.*, 2011). Western-Blotexperimente mit Zelllysaten der Labormutante C405, die in der stationären Phase hergestellt wurden, zeigten weiterhin eine noch geringere Menge an Penicillin-Bindeprotein 2x, die mit der erhöhten HtrA-Menge in dem Stamm korreliert (Peters, 2009). Die Erklärung für die verkürzten Zelllängen von C405 könnte somit bei der Serinprotease HtrA liegen, die das veränderte PBP2x aus C405 abbaut und somit sowohl die Morphologie, als auch das Wachstumsverhalten normalisiert, da für den Stamm C405 keine vorzeitige Lyse, sondern eine verlängerte stationäre Phase nachgewiesen werden konnte.

3.5 Resistenzunterschiede der Ausgangsstämme

Die spontanen Cefotaxim-resistenten Labormutanten C405 und C606 wurden bereits eingehend sowohl phänotypisch, als auch genotypisch charakterisiert (Laible und Hakenbeck, 1987; 1991; Laible *et al.*, 1989; Maurer *et al.*, 2008 und Zerfaß, 2010). Trotz dessen wurde die Resistenz dieser bereits gut untersuchten Laborstämme gegenüber Cefotaxim bei 30 °C und bei 37 °C erneut untersucht, um sicher zu stellen, dass es sich tatsächlich um die ursprünglichen Mutanten handelt. Des Weiteren wurde die Cefotaxim-Resistenz der Stämme *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 (Koch, 2006; Maurer *et al.*, 2008), bei denen bereits eindeutig eine zu R6 verringerte PBP2x-Menge festgestellt wurde (Kap. 3.3), ebenfalls bei beiden Temperaturen ermittelt.

Dem Stamm R6_{pbp2xC606}-T1 fehlt als einziges der G422D-Austausch in PBP2x aus C606, der bei 37 °C bekanntlich eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim vermittelt (Krauß *et al.*, 1996; Zerfaß, 2010). Dagegen beinhaltet der Stamm R6_{pbp2xC405}-T5 nur den L403F-Austausch im PBP2x, dem ebenfalls eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C, die die MHK bei 37 °C sinken lässt, nachgesagt wird (Krauß *et al.*, 1996). Daher wurden die beiden Stämme R6_{pbp2xC405}-T5 und R6_{pbp2xC606}-T1 dahingehend untersucht. Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchung der Ausgangsstämme gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C sind in Abb. 3.17 zu finden.

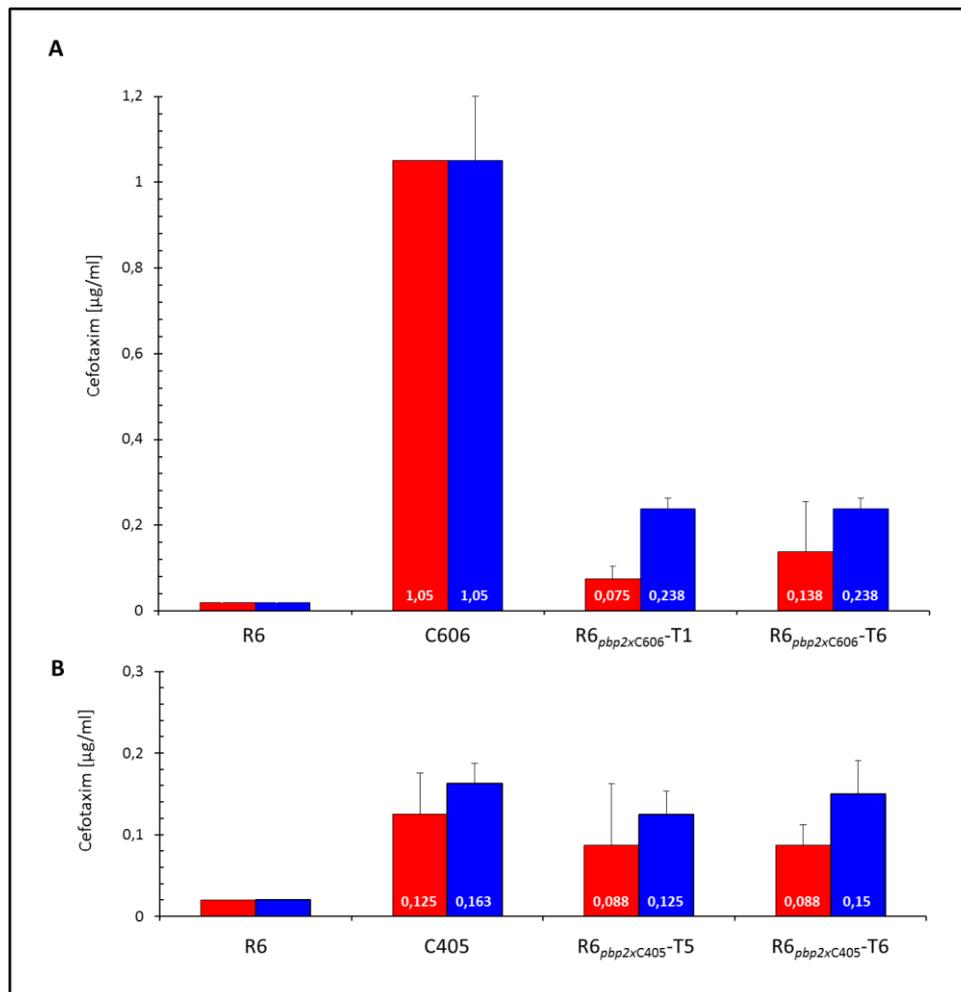


Abb. 3.17: Resistenz der Ausgangsstämme gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C und bei 30 °C. A: MHK-Werte der Stämme R6, C606, R6_{pbp2xC606}-T1 (R6, PBP2x M289T, G597D, G601V) und R6_{pbp2xC606}-T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V). **B:** MHK-Werte der Stämme R6, C405, R6_{pbp2xC405}-T5 (R6, PBP2x L403F) und R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S). Die MHK-Werte wurden mit Hilfe der Agardilutionsmethode ermittelt. Die Cefotaximkonzentration ist in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Die Abstufung der Antibiotikakonzentration erfolgte in 0,05er $[\mu\text{g/ml}]$ Schritten. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen in C-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 30 inkubiert. Die Mittelwerte der ermittelten MHK-Werte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind als farbige Balken dargestellt (rot: 37 °C, blau: 30 °C). Dabei geben schwarze Fehlerbalken die Standardabweichungen und die Zahlen an der Basis der Balken die gerundeten Mittelwerte an.

Der Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 weist, sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C eine MHK von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ auf. Dies stimmt mit den Literaturwerten (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991; Maurer *et al.*, 2008) überein. Mit einer MHK von 1,05 besitzt der verwendete Laborstamm C606 bei beiden Temperaturen laut den ermittelten Ergebnissen die höchste Cefotaxim-Resistenz. In der Literatur wird für diesen Laborstamm eine im Vergleich zu R6 64fach erhöhte MHK von 1,28 $\mu\text{g/ml}$ bei 30 °C beschrieben (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991). Maurer *et al.*, 2008 gibt für den Stamm C606 dagegen eine MHK von 0,8-1,3 $\mu\text{g/ml}$ Cefotaxim bei 30 °C an. Diese Literaturwerte, die die MHK von C606 bei 30 °C betreffen, konnten demnach bestätigt werden. Weitere Studien (Krauß *et al.*, 1996; Zerfaß, 2010) belegten für C606 eine Hypersensitivität gegenüber

Cefotaxim, sobald eine Inkubation der Zellen bei 37 °C durchgeführt wurde. Dieser Effekt konnte allerdings nicht bestätigt werden. Bekanntermaßen ist der Stamm C606 jedoch anfällig für den Wegfall dieser Temperatursensitivität (Zerfaß, 2010). Auf der Suche nach einem Klon des C606 Stamms, der diese Hypersensitivität aufweist, wurde zu Beginn der Arbeit die MHK zahlreicher Glycerinkulturen der Stammsammlung, sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C ermittelt; jedoch ohne Erfolg.

Um kompensatorische Mutationen in *pbp2x*, *ciaR* und *ciaH* auszuschließen, wurden diese Gene nachsequenziert. Es wurden keine zusätzlichen Mutationen, als die bereits beschriebenen, nachgewiesen. Demnach ist die Ursache der mangelnden Ausprägung des Effekts der Temperatursensitivität nicht in zusätzlichen, möglicherweise kompensatorischen Mutationen in diesen Genen zu finden.

Der Stamm *S. pneumoniae* R6_{*pbp2xC606*}-T6 beinhaltet die vier AS-Austausche M289T, G422D, G597D und G601V aus C606 in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x. Für diesen Stamm konnte bei 30 °C eine Cefotaxim MHK von $0,238 \pm 0,025$ µg/ml ermittelt werden. Dieser MHK-Wert liegt laut Literatur (Maurer *et al.*, 2008: 0,25 µg/ml und Zerfaß, 2010: 0,25 – 0,3 µg/ml) im gleichen Bereich. Bei Inkubation bei 37 °C wurde für diesen Stamm dagegen eine ca. 1,7fach erniedrigte MHK nachgewiesen. Bei Zerfaß wurde für *S. pneumoniae* R6_{*pbp2xC606*}-T6 dagegen eine 3 bis 6fache Verringerung der MHK und somit eine Temperatur-Hypersensitivität für Cefotaxim nachgewiesen. Die für C606 zuvor beschriebene Temperatursensitivität konnte demnach zum Teil in R6 übertragen werden (Koch, 2006; Zerfaß, 2010). Die erhaltenen MHK-Werte von R6_{*pbp2xC606*}-T6 ($0,138 \pm 0,118$ µg/ml) deuten ebenfalls eine Temperatursensitivität für Cefotaxim bei 37 °C an, allerdings ist der Effekt etwas schwächer ausgeprägt, als zuvor beschrieben.

Der Stamm R6_{*pbp2xC606*}-T1, dem der Austausch G422D in PBP2x aus C606 fehlt, weist bei 30 °C eine identische MHK zu R6_{*pbp2xC606*}-T6 auf. Demnach wirkt sich das Fehlen des G422D-Austausches nicht negativ auf die MHK bei 30 °C aus. Dies bestätigt bereits vorhandenen Daten (Koch, 2006).

Eine Temperatursensitivität für Cefotaxim dieses Stamms bei 37 °C wurde bereits gezeigt (Koch, 2006); dabei waren die ermittelten MHK-Werte (30 °C: 0,5 µg/ml; 37 °C: 0,19 µg/ml) insgesamt zwar höher; zeigten jedoch im Vergleich eine ca. 2,6fache Verringerung der MHK während der Inkubation bei 37 °C. Eine Übertragung der Temperatursensitivität in R6 wurde bereits zuvor nachgewiesen, auch wenn sie mit einzelnen AS-Austauschen in PBP2x nicht in Verbindung gebracht werden konnte (Koch, 2006, Zerfaß, 2010). Bei der Untersuchung der Temperatursensitivität wurde in früheren Studien kein deutlicher Unterschied in der Ausprägung des Effekts in den Stämmen R6_{*pbp2xC606*}-T1 und R6_{*pbp2xC606*}-T6 nachgewiesen (Koch, 2006). Hierbei wurden allerdings zur Feststellung der MHK der Stämme E-Teststreifen verwendet, die ungenauer sind, als die hier verwendete Methode (Kap. 2.6.5).

Dem hier dargestellten Ergebnis nach zur Folge, begünstigt das Fehlen von G422D die Ausprägung der Temperatursensitivität zusätzlich. Dies steht im Gegensatz zu der Vermutung, dass G422D für die Temperatursensitivität für Cefotaxim verantwortlich ist. Wäre dies tatsächlich der Fall, müsste die MHK bei 37 °C bei R6_{*pbp2xC606*}-T1, dem G422D fehlt, nicht erniedrigt, sondern erhöht sein.

Den Laborstamm C405 kennzeichnet eine MHK für Cefotaxim bei 30 °C von $0,163 \pm 0,025$ µg/ml. Die bestätigt bereits vorhandene Literaturwerte (Maurer *et al.*, 2008: 0,15-0,2 µg/ml). Bei Inkubation diese Stamms bei 37 °C sinkt die ermittelte MHK leicht auf $0,125 \pm 0,05$ µg/ml ab. Für C405 wurde eine Hypersensitivität gegenüber Cefotaxim bei einer Inkubation bei 37 °C festgestellt. Dabei erreichte C405 während der Inkubation bei 30 °C ca. 0,75 µg/ml, wohingegen dieser Stamm bei 37 °C lediglich eine MHK von 0,2 µg/ml aufwies (Krauß *et al.*, 1996).

Die in dieser Arbeit ermittelten MHK-Werte für C405 könnten in abgeschwächter Form auf die von Krauß *et al.*, 1996 beschriebene Temperatursensitivität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C zurückzuführen sein, die ihre Ursache womöglich in dem Temperatursensitivität vermittelnden L403F-Austausch hat. Um diese Vermutung zu analysieren, wurde die MHK für Cefotaxim der Stämme R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC405}-T5 ebenfalls bei beiden Temperaturen ermittelt. Der Stamm R6_{pbp2xC405}-T6 wies bei 30 °C eine MHK von $0,15 \pm 0,04$ µg/ml auf; was wiederum mit bereits bekannten Daten korreliert (Maurer *et al.*, 2008: 0,15-0,2 µg/ml). Für R6_{pbp2xC405}-T5 wurde bei 30 °C hingegen eine leicht verringerte MHK bei $0,125 \pm 0,029$ µg/ml gemessen. Dies stimmt mit Daten von Koch, 2006 überein. Beim Vergleich der MHK von R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC405}-T5 konnte dabei eine stärkere Erniedrigung (ca. um die Hälfte) verzeichnet werden. Die ermittelte MHK für Cefotaxim bei 37 °C ist bei beiden Stämmen dagegen identisch und liegt mit 0,088 µg/ml deutlich unter der jeweils ermittelten MHK bei 30 °C. Dies zeigt eine vorhandene Temperatursensitivität in beiden Stämmen an, die allein auf die Anwesenheit von L403F zurückzuführen ist.

Kleine Schwankungen zwischen den hier erhaltenen MHK und den Literaturwerten könnten durch eine veränderte Methode zur Überprüfung der MHK zu erklären sein. Im Gegensatz zu Zerfaß, 2010 und Koch, 2006 wurden die zu analysierenden Stämme nicht mittels Glasstab auf D-Blutagarplatten ausgestrichen, sondern eine geeignete Verdünnung aufgetropft (Kap. 2.6.5).

3.6 Nachstellung der Situation im definierten genetischen Hintergrund

Die Laborstämme *S. pneumoniae* C405 und C606 besitzen neben den bekannten Mutationen in *pbp2x* und *ciaH* mögliche weitere Mutationen. Um eine Beteiligung von nicht berücksichtigten Mutationen in den Laborstämmen an den bisherigen Ergebnissen auszuschließen, wurde die bisher bekannte Situation im genetisch definierten Hintergrund nachgestellt.

Hierfür wurde das Gen *htrA* mit Hilfe einer Cheshire-Kassette in den Stämmen *S. pneumoniae* R6, R6_{*pbp2x*C606}-T6 und R6_{*pbp2x*C405}-T6 deletiert (Weng *et al.*, 2009; Kap. 2.7.3.2). Die Verwendung dieser temporären, sich selbst deletierenden Erythromycin-Resistenzkassette, hat den großen Vorteil, dass nach erfolgter Deletion des Gens, lediglich eine kleine Narbe im Genom zurückbleibt. Dadurch werden Effekte auf stromabwärts liegende Gene (in diesem Fall *parB*), die mit dem Einbringen einer Resistenzkassette einhergehen, vermieden (Weng *et al.*, 2009).

Anschließend wurde das Gen *htrA* in den hergestellten Deletionsstämmen komplementiert. Dabei wurden Komplementationsstämme mit den unterschiedlich starken Promotoren P_{*htrA*}, P_{*vegM*} und P_{*16S rRNA*} vor *htrA* erstellt. Somit sollte die Expression von *htrA* stufenweise erhöht werden und korrelierend dazu wurden jeweils verringerte PBP2x-Mengen in den erstellten Stämmen erwartet.

3.6.1 *In vivo*-Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren P_{*htrA*}, P_{*vegM*} und P_{*16S rRNA*}

Um die Aktivitäten der Promotoren P_{*htrA*} und P_{*vegM*} in *S. pneumoniae* R6 zu ermitteln, wurden bereits vorhandene Stämme *S. pneumoniae* RKL43 (*bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ*, Halfmann *et al.*, 2007b) und RKL45 (*bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ*, Halfmann *et al.*, 2007b) verwendet. Diese Stämme dienen als positive Kontrollen.

Es ist bereits bekannt, dass der Promotor P_{*htrA*} in pPP2 in *S. pneumoniae* R6 mittelstark ist und am Ende der exponentiellen Wachstumsphase eine β -Galaktosidaseaktivität von 134 ± 12 Units aufweist (Halfmann, 2008). Der Promotor P_{*htrA*} zeigt in dem Stamm *S. pneumoniae* RKL168 (R6 *ciaH306*) eine Aktivität von 875 ± 40 Units (Halfmann, 2008). Die Aktivität des starken Promotors P_{*vegM*} in *S. pneumoniae* R6 ist dagegen in diesem Zeitraum mit 987 ± 91 Units wesentlich höher (Halfmann, 2008). Da der Promotor P_{*vegM*} somit ca. der Stärke des *ciaH306*-Allels entspricht, wurde er für die folgenden Untersuchungen und zur Herstellung der Komplementationsstämme verwendet. Als negative Kontrolle diente der Stamm *S. pneumoniae* R6 PP2 (*bgaA::tetM-lacZ*, Halfmann, 2008).

Um einen noch stärkeren Promotor als P_{*vegM*} bei den *htrA* überexprimierenden Komplementationsstudien bereit zu stellen, wurde das Reporterplasmid pKP02, welches einen Promotor P_{*16S rRNA*} vor dem Gen *htrA* beinhaltet, konstruiert.

Dieser Promotor wurde zuvor mittels der Funktion Motif Search (<http://nbc3.biologie.uni-kl.de>) im *S. pneumoniae* Genom gesucht. Als Startmotif wurde hierfür die Sequenz TTGACA (entspricht der -35-Region) und als Endmotif TATAAT (-10-Region) festgelegt. Die maximale Distanz zwischen Start- und Endmotif durfte dabei lediglich 18 bp betragen. Diese Parameter wurden für die Promotor-

suche gewählt, da die sieben rRNA Promotoren aus *E. coli* bekanntlicherweise jeweils 6-stellige Konsensussequenzen der -10- und der -35-Regionen besitzen, was eine effiziente Erkennung durch das $\sigma 70$ -beinhaltende RNAP Holoenzym ermöglicht. Zusätzlich liegen zwischen der -10- und der -35-Region 16 bp (Paul *et al.*, 2004).

Die festgelegte, 88 bp große Promotorregion des $P_{16S\ rRNA}$ wurde amplifiziert und vor das promotorlose Gen '*lacZ*' in das Plasmid pPP2 kloniert. Dieses Promotor Probe Plasmid besitzt die Signale zur Translationsinitiation des Gens *htrA* aus *S. pneumoniae* (Halfmann *et al.*, 2007). Die Abb. 3.18 zeigt die Promotorregion des verwendeten $P_{16S\ rRNA}$ nach der Klonierung in pPP2.

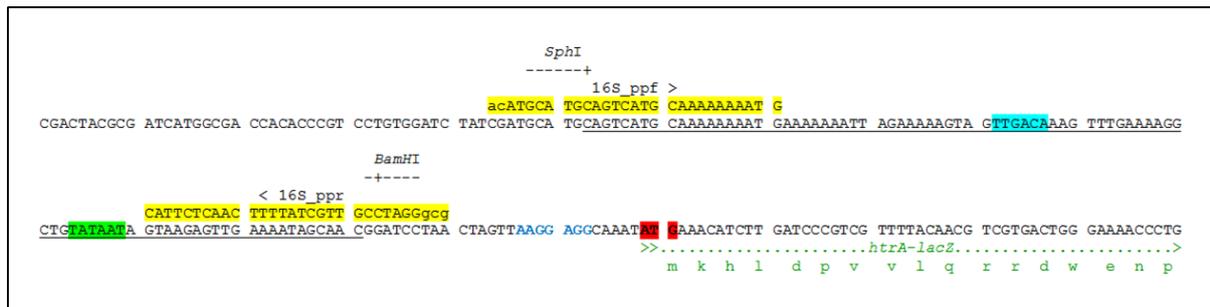


Abb. 3.18: Promotorregion des 16S rRNA-Promotors aus *S. pneumoniae* nach der Klonierung in pPP2. Dargestellt wurde die Sequenz des verwendeten 16S rRNA-Promotors (unterstrichen) aus dem Genom von *S. pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098) nach der Klonierung in das Promotorprobeplasmid pPP2. Die zur Amplifikation des 16S rRNA-Promotors verwendeten Oligonukleotide sind gelb dargestellt. Die durch die Oligonukleotide angefügten Schnittstellen *Bam*HI und *Sph*I sind angegeben. Die -35-Region ist hellblau und die -10-Region grün unterlegt. Die Ribosomenbindestelle von *htrA* (Shine-Dalgarno-Sequenz, SD) ist in blauer Schrift dargestellt. Das Startcodon ist fett gedruckt und rot markiert. Die grün gepunktete Linie kennzeichnet das jeweilige Gen und unterhalb dieser Linie ist die translatierte AS-Sequenz angegeben.

Das hergestellte Plasmidkonstrukt pKP02 wurden in kompetente *S. pneumoniae* Zellen transformiert und die erhaltenen Transformanten mit Hilfe von Kolonie-PCR und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde die Promotorstärke des $P_{16S\ rRNA}$ in dem erstellten Stamm *S. pneumoniae* KPKL2 (*bgaA::tetM-P_{16S\ rRNA}-lacZ*) mittels β -Galaktosidaseassays (Kap. 2.8.2) im Verlauf des Wachstums gemessen. Zeitgleich wurden die Stämme *S. pneumoniae* PP2, RKL43 und RKL45 ebenfalls untersucht. Den parallel wachsenden Kulturen wurden hierfür an sechs Zeitpunkten Proben entnommen. Die erste Probe wurde beim Erreichen einer Zelldichte von N 30 entnommen. Weitere Proben wurden bei Zelldichten von N 60, N 90, N 120 und N 150 gezogen. Die letzte Probe wurde den Kulturen 30 min nach Erreichen der Nephelo von 150, zu Beginn der stationären Wachstumsphase entnommen. Die β -Galaktosidaseaktivität der Proben wurde untersucht. Die Abb. 3.19 veranschaulicht die ermittelten Promotoraktivitäten der Promotoren P_{htrA} , P_{vegM} und $P_{16S\ rRNA}$ in *S. pneumoniae* R6 aus zwei unabhängigen Experimenten. In Tab. 3.2 sind die Werte der gemessenen β -Galaktosidaseaktivität und die genauen Zelldichten der untersuchten Kulturen dargestellt.

Tab. 3.2: Durch die Promotoren P_{htrA} , P_{vegM} , und $P_{16S rRNA}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität im Stamm *S. pneumoniae* R6.

Stamm	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	Zelldichte [N]	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung ^a
RKL45	P_{htrA}	29	237 \pm 16
		59	256 \pm 21
		90	160 \pm 42
		122	227 \pm 31
		147	232 \pm 28
		156	270 \pm 7
RKL43	P_{vegM}	30	918 \pm 46
		64	1.025 \pm 7
		88	945 \pm 64
		130	1.055 \pm 35
		159	1.167 \pm 76
		161	1.223 \pm 18
KPKL2	$P_{16S rRNA}$	28	5.398 \pm 336
		58	5.403 \pm 265
		90	5.307 \pm 180
		127	5.102 \pm 426
		144	4.934 \pm 359
		156	4.719 \pm 764

^a Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um den Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen.

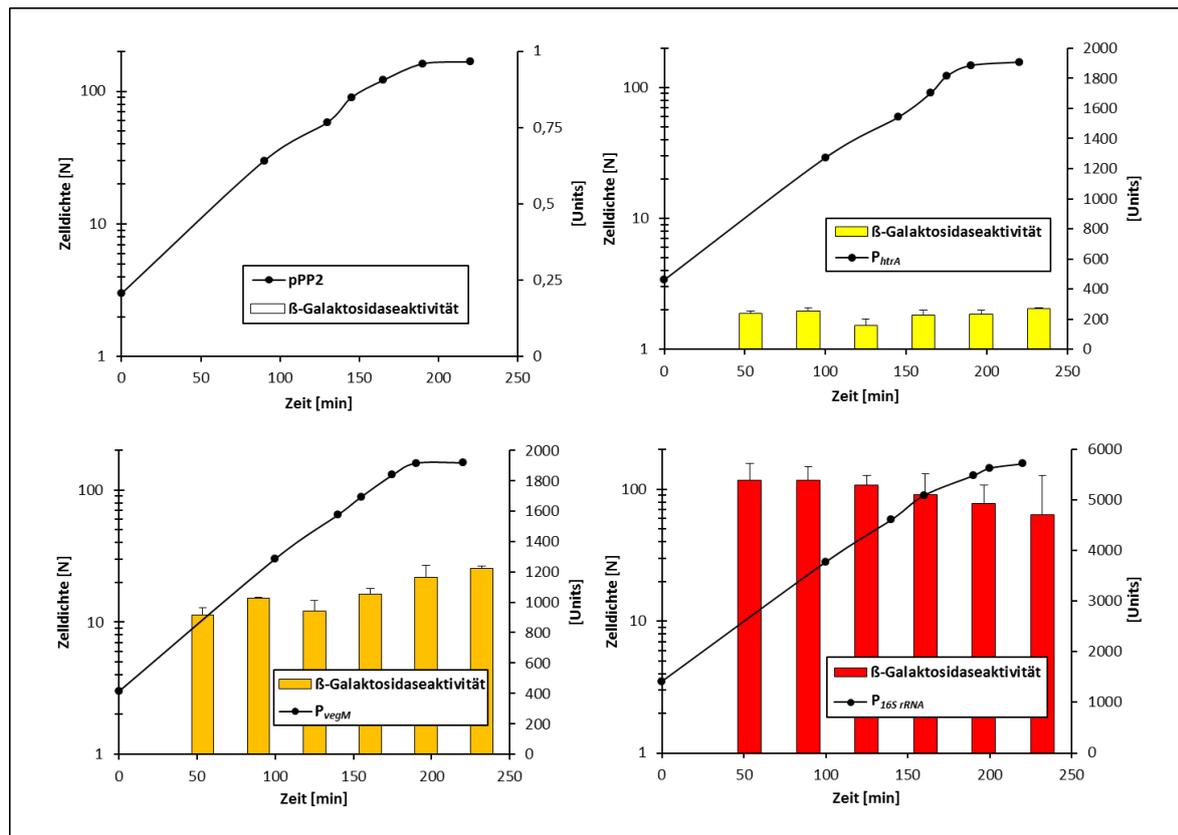


Abb. 3.19: Promotoraktivitäten der Promotoren P_{htrA} , P_{vegM} und $P_{16S rRNA}$ in *S. pneumoniae* R6. Dargestellt sind die ermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten in Units [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] von P_{PPP2} (weiß), P_{htrA} (gelb), P_{vegM} (orange) und $P_{16S rRNA}$ (rot) in Abhängigkeit von der Zelldichte [N] der jeweiligen Kulturen *S. pneumoniae* PP2, RKL43, RKL45, KPKL2 und von der Zeit [min]. Die Mittelwerte der ermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten aus zwei unabhängigen Experimenten sind als farbige Balken dargestellt. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die jeweiligen Wachstumskurven stellen ein Beispiel aus zwei Versuchen dar.

Der Kontrollstamm *S. pneumoniae* PP2 zeigt über das Wachstum hinweg keine nachweisbare β -Galaktosidaseaktivität. Der native Promotor P_{htrA} ist bereits als mittelstarker und P_{vegM} als starker Promotor beschrieben.

Aus Abb. 3.19 und Tab. 3.2 ist zu erkennen, dass der Promotor P_{htrA} in dem Stamm RKL45 über das Wachstum hinweg eine etwas schwankende β -Galaktosidaseaktivität von ca. 200 Units aufweist.

Der Promotor P_{vegM} (RKL43) verhält sich mit Aktivität um ca. 1000 Units, wie erwartet, als starker, konstitutiver Promotor. Beide unabhängig voneinander durchgeführten β -Galaktosidaseassays lieferten bis auf leichte Schwankungen gleiche Ergebnisse. Die ermittelten Mittelwerte der Promotoraktivität von $P_{16S\ rRNA}$ liegen im Verlauf des Wachstums zwischen ca. 4.700 und 5.400 Units. Die Promotoraktivität von $P_{16S\ rRNA}$ ist somit über das komplette Wachstum hinweg ca. 5fach höher, als die des Promotors P_{vegM} . Der Promotor $P_{16S\ rRNA}$ lässt sich demnach als sehr starker und konstitutiver Promotor einordnen.

3.6.2 Komplementationsstudien von *htrA* im genetischen Hintergrund von R6

3.6.2.1 Komplementationsstudien mit den Konstrukten P_{htrA} -*htrA* und P_{vegM} -*htrA*

In dem Stamm *S. pneumoniae* R6 wurde mit Hilfe der Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009; Kap. 2.7.3.2) das Gen *htrA* deletiert. Auf diese Weise entstand der Stamm KPKL1, der für die Herstellung von *htrA* Komplementationsstämmen im genetischen Hintergrund von R6 verwendet wurde. Das hergestellte Integrationsplasmid pKP01 wurde in den Stamm KPKL1 transformiert und somit der Komplementationsstamm KPKL11 (R6 $\Delta htrA$ P_{htrA} -*htrA*) erstellt. Das Plasmid pKP01, das *htrA* mit nativem Promotor beinhaltet, integriert sich durch homologe Rekombination über die Gene spr0566, spr0567, spr0568 und 'bgaA' in das Genom. Ein weiterer Komplementationsstamm, KPKL12 (R6 $\Delta htrA$ P_{vegM} -*htrA*) wurde dagegen durch die Transformation des Ligationsansatzes erfolgreich generiert (Kap. 2.7.3.3). Die Überprüfung der Transformanten mittels Kultur-PCR zeigte bei allen erstellten Transformanten eine erfolgreiche und korrekte Integration in das Genom. Die Sequenzierungsergebnisse der Stämme KPKL11 und KPKL12 bestätigten zusätzlich die Abwesenheit von Punktmutationen.

Die HtrA-Mengen der erstellten *htrA* - Komplementationsstämmen KPKL11 (R6 $\Delta htrA$ P_{htrA} -*htrA*) und KPKL12 (R6 $\Delta htrA$ P_{vegM} -*htrA*) wurden mittels Western-Blotanalysen mit dem polyklonalen α -HtrA-Antikörper (Sebert *et al.*, 2005) untersucht. Als Kontrollen dienten die Stämme *S. pneumoniae* R6, KPKL1 und die Laborstämme, die eine erhöhte HtrA-Proteinmenge aufweisen, C405 und C606. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3.20 dargestellt.

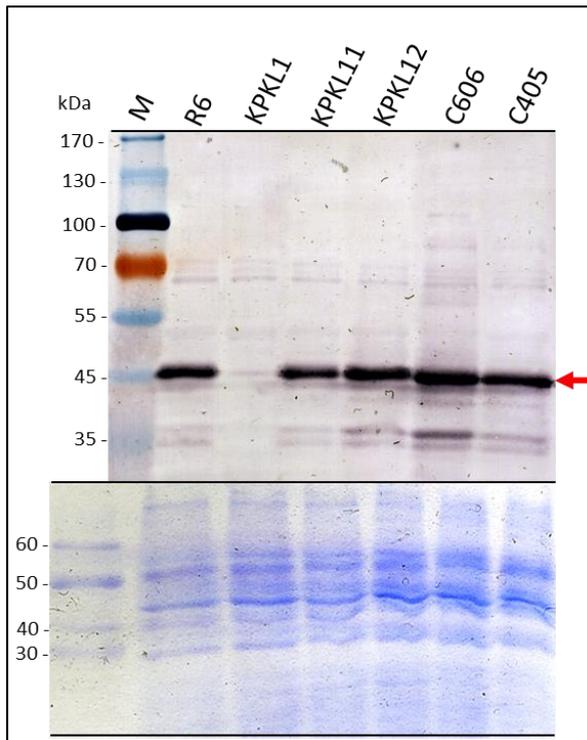


Abb. 3.20: Untersuchung der Komplementationsstämme KPKL11 und KPKL12 mittels Western-Blotanalysen zur Detektion der HtrA-Mengen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zelllysate, die zuvor bei 37 °C bei einer Zelldichte von N 70 hergestellt wurden. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL1(R6 $\Delta htrA$), KPKL11 (R6 $\Delta htrA$ P_{htrA}-htrA), KPKL12 (R6 $\Delta htrA$ P_{vegM}-htrA). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 1,75 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Ein weiteres 10 %iges SDS-Gel wurde ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA- (Sebert *et al.*, 2005; 1:1.000) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die HtrA-Proteine sind durch einen roten Pfeil (ca. 45 kDa) markiert.

Das Protein HtrA kann bei dem Deletionsstamm KPKL1 nicht nachgewiesen werden. Im Zelllysate des Komplementationsstamms KPKL11 kann die gleiche HtrA-Proteinmenge wie im Stamm *S. pneumoniae* R6 detektiert werden. Der Stamm KPKL12, der den stärkeren Promotor P_{vegM} vor dem Gen *htrA* beinhaltet, zeigt eine leichte Überproduktion an HtrA. Dies wird deutlich durch eine etwas stärkere HtrA-Bande bei 45 kDa und vor allen durch die im Vergleich zu R6 und KPKL11 erhöhte Menge der beiden Abbauprodukte von HtrA bei ca. 35 kDa. Die HtrA-Menge korreliert in dem Stamm KPKL12 ungefähr mit der Menge dieses Proteins in *S. pneumoniae* C405, erreicht allerdings das überexprimierte Niveau in C606 nicht.

Wachstumsanalysen der Komplementationsstämme *S. pneumoniae* KPKL11 und KPKL12

Das Wachstumsverhalten des Deletionsstamms KPKL1 und der Komplementationsstämme KPKL11 und KPKL12 wurden im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 über den Zeitraum von 600 min sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C analysiert. In Abb 3.21 sind die Ergebnisse dieser Analysen gezeigt und in Tab. 3.3 sind die ermittelten Generationszeiten der untersuchten Stämme aufgeführt. Aus Abb. 3.21 A wird deutlich, dass sich das Wachstum der Stämme bei 30 °C nicht voneinander unterscheidet. Die ermittelten Generationszeiten von 45-46 min sind dabei fast identisch. Demnach hat das Ausschalten oder eine leichte Überexpression von HtrA im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 im beobachteten Zeitraum keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten bei 30 °C.

Dagegen zeigt der Deletionsstamm KPKL1 im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 bei 37 °C eine verkürzte stationäre Phase (Abb. 3.21 B) und mit 32 min eine etwas verlängerte Generationszeit (Tab. 3.3). Dies spricht dafür, dass das Ausschalten der Serinprotease in *S. pneumoniae* R6 das Wachstum bei

37 °C leicht negativ beeinflusst. Der Komplementationsstamm KPKL11 zeigt dasselbe Wachstumsverhalten bei 37 °C wie der Kontrollstamm R6 und mit 28 min eine identische Generationszeit zu R6. Dies ist ein Hinweis für die erfolgreiche Komplementation von *htrA*, da der leichte negative Effekt beim Wachstum von KPKL1 bei 37 °C im Stamm KPKL11 kompensiert wird.

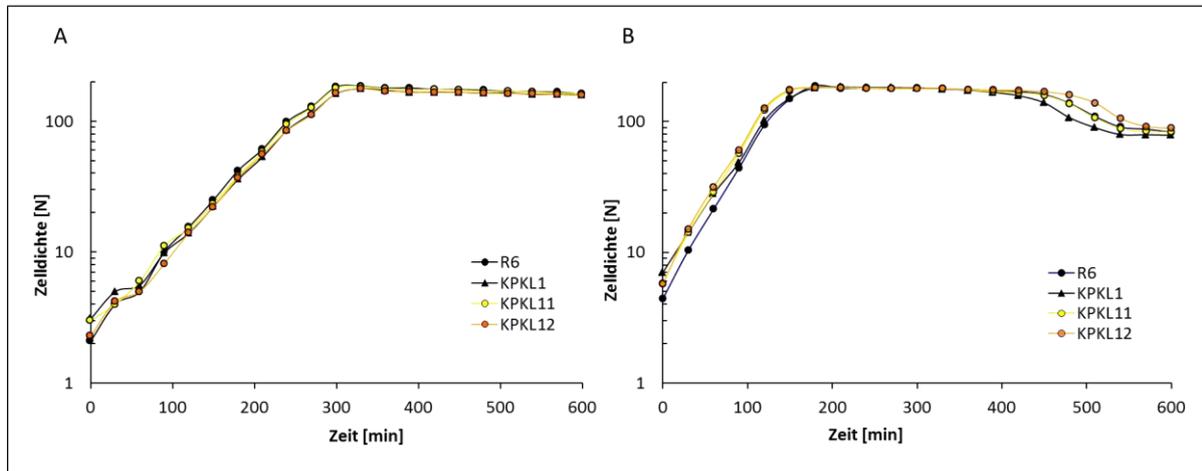


Abb. 3.21: Wachstumsanalysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL11, KPKL12 und den Kontrollstämmen R6, KPKL1 bei 30 °C und bei 37 °C. Dargestellt ist das Wachstumsverhalten der Stämme *S. pneumoniae* KPKL1 (R6 $\Delta htrA$), KPKL11 (R6 $\Delta htrA$ P_{htrA} -*htrA*) und KPKL12 (R6 $\Delta htrA$ P_{vegM} -*htrA*) und des Kontrollstamms *S. pneumoniae* R6 sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C. In **A** ist das Wachstumsverhalten der angegebenen Stämme bei 30 °C gezeigt, während in **B** das Wachstumsverhalten bei 37 °C dargestellt ist. Die Stämme wurden in einer Vorkultur bei 30°C bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen und anschließend in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium angeimpft und bei 30 °C bzw. 37 °C weiter inkubiert. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. In der Abbildung wurde die Zelldichte halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Der Komplementationsstamm KPKL12 zeigt bei den Wachstumsanalysen bei 37 °C im Vergleich zu R6 eine etwas verlängerte stationäre Phase und eine um 2 min verlängerte Generationszeit (Tab. 3.3). Eine leichte Überexpression von HtrA im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 hat demnach ebenfalls einen leichten Einfluss auf das Wachstumsverhalten bei 37 °C.

Tab. 3.3: Generationszeiten der Stämme *S. pneumoniae* KPKL11, KPKL12 und der Kontrollstämmen R6, KPKL1 bei 30 °C und bei 37 °C.

Stamm	g^* [min] bei 30 °C	g^* [min] bei 37 °C
R6	45	28
KPKL1	46	32
KPKL11	45	28
KPKL12	46	30

* g : Generationszeit: Die Generationszeit wurde anhand der in Abb. 3.21 dargestellten Wachstumskurven rechnerisch ermittelt.

3.6.2.2 Komplementationsstudien mit den Konstrukten $P_{16S\ rRNA}\text{-}htrA$

Im Fall der Komplementation von *htrA* mit $P_{16S\ rRNA}\text{-}htrA$ wurde zunächst ein Fusionskonstrukt mittels überlappender PCR konstruiert (Kap. 2.7.3.3). Bei der Transformation des Ligationsansatzes des Konstrukts in *E. coli* Zellen konnten zwar Transformanten hergestellt werden, allerdings wurden diese nach dem Überpicken der Kolonien auf frische LB-Platten mit dem Selektionsantibiotikum zunächst durchsichtig und starben anschließend. Zur Erstellung der Komplementationsderivate mit $P_{16S\ rRNA}\text{-}htrA$ wurden deshalb Ligationsansätze direkt in kompetente *S. pneumoniae* Zellen transformiert (Kap. 2.7.3.3). Die im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 erstellten Transformanten wurden mittels Kultur-PCR überprüft und zeigten eine korrekte Integration in das Genom. Fünf dieser Transformanten wurden mittels Sequenzierung überprüft. Überraschenderweise wiesen alle untersuchten Transformanten Punktmutationen auf, die entweder im Gen *htrA*, in den intergenen Bereichen zwischen $P_{16S\ rRNA}$ und dem Gen *htrA* oder $\text{spr0566}'$ und $P_{16S\ rRNA}$ lokalisiert waren. In Tab. 3.4 sind die identifizierten Mutationen in diesen Stämmen und die mit ihnen einhergehenden AS-Austausche in HtrA dargestellt.

Tab. 3.4: Übersicht der Mutationen in den $P_{16S\ rRNA}\text{-}htrA$ -Komplementationsstämmen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6.

Stamm	Mutationen	AS-Austausch in HtrA
KPKL131	<i>htrA</i> G703A	G235S in der Proteasedomäne
KPKL132	Intergener Bereich zwischen $P_{16S\ rRNA}$ und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 5. bp (ein A)	
KPKL133	Intergener Bereich zwischen $P_{16S\ rRNA}$ und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 13. bp (ein G) Intergener Bereich zwischen $\text{spr0566}'$ und $P_{16S\ rRNA}$: stromabwärts des Stoppcodons von $\text{spr0566}'$ fehlt das 11. bp (ein G)	
KPKL134	Intergener Bereich zwischen $P_{16S\ rRNA}$ und <i>htrA</i> : stromabwärts des +1 für <i>htrA</i> fehlt das 13. bp (ein G) Intergener Bereich zwischen $\text{spr0566}'$ und $P_{16S\ rRNA}$: stromabwärts des Stoppcodons von $\text{spr0566}'$ fehlt das 11. bp (ein G)	
KPKL135	<i>htrA</i> A361G	N121D in der Proteasedomäne

Um die Funktionsfähigkeit der erstellten $P_{16S\ rRNA}\text{-}htrA$ -Komplementationsstämme und mögliche Auswirkungen der identifizierten Mutationen zu untersuchen, wurden Zelllysate der ausgewählten Stämme KPKL131, KPKL134, KPKL135 mittels Western-Blotanalysen analysiert. Hierfür wurden α -HtrA- und α -PBP2x-Antikörper verwendet. Als Kontrollstämme dienten neben *S. pneumoniae* R6, C405 und C606, auch die bereits in Abb. 3.20 gezeigten Stämme KPKL1, KPKL11 und KPKL12. Die Abb. 3.22 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

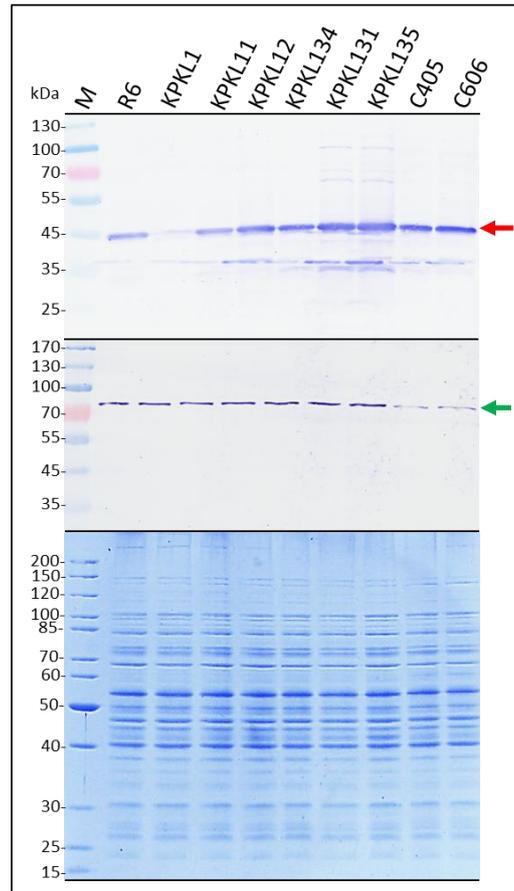


Abb. 3.22: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zellysate, die zuvor bei 37 °C bei einer Zelldichte von $N 70$ hergestellt wurden. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL1 (R6 $\Delta htrA$), KPKL11 (R6 $\Delta htrA$ P_{htrA} - $htrA$), KPKL12 (R6 $\Delta htrA$ P_{vegM} - $htrA$), KPKL134 (R6 $\Delta htrA$ $P_{16S rRNA}$ - $htrA$, Mutation im intergener Bereich zwischen $P_{16S rRNA}$ und $htrA$ und im intergener Bereich, s. Tab. 3.4), KPKL131 (R6 $\Delta htrA$ $P_{16S rRNA}$ - $htrA$, HtrA G235S), KPKL135 (R6 $\Delta htrA$ $P_{16S rRNA}$ - $htrA$, HtrA N121D). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Zwei weitere 10 %ige SDS-Gel wurden ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA 12003 (1:30.000; diese Arbeit; oben) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca. 45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 82 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

Der Stamm KPKL12 weist zwar, wie bereits beschrieben, aufgrund des stärkeren Promotors P_{vegM} vor dem Gen $htrA$, eine im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 erhöhte HtrA-Menge auf. Dies wirkt sich allerdings nicht auf die PBP2x-Menge in diesem Stamm aus; die unverändert zu der im Wildtypstamm R6 auftretenden PBP2x-Menge ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das PBP2x-Protein essentiell ist und zudem im Wildtypstamm keine Mutationen aufweist, die sich negativ auf die Faltung auswirken und dadurch einen Abbau begünstigen könnten.

Der $P_{16S rRNA}$ - $htrA$ -Komplementationsstamm KPKL134 besitzt eine leicht höhere HtrA-Mengen, aber eine ähnliche PBP2x, wie R6. Da in diesem Stamm eine Mutation in dem intergenen Bereiche zwi-

schen $P_{16S\ rRNA}$ und *htrA* und eine in dem intergenen Bereich zwischen spr0566' und $P_{16S\ rRNA}$ (Tab. 3.4) identifiziert wurde, deutet dies darauf hin, dass möglicherweise darin der Grund zu finden ist, dass die Proteinmenge an HtrA nicht so hoch ist wie erwartet. Die Sequenzierergebnisse von KPKL133 lieferten identische Mutationen zu dem Stamm KPKL134 (Tab. 3.4).

Die beiden $P_{16S\ rRNA}$ -*htrA*-Komplementationsstämme KPKL131 und KPKL135 besitzen deutlich erhöhte HtrA-Menge. Neben den stärkeren HtrA-Banden bei ca. 45 kDa, lassen sich bei beiden Stämmen stärkere Abbaubanden bei ca. 35 kDa und zusätzliche Banden bei ca. 55 kDa und 100 kDa auf dem Western-Blot mit α -HtrA-Antikörpern erkennen. Demnach wird in beiden Stämmen HtrA aufgrund des sehr starken Promotors $P_{16S\ rRNA}$ vor dem *htrA* erfolgreich überexprimiert. Allerdings ist aufgrund des Western-Blots mit α -PBP2x-Antikörpern anzunehmen, dass sowohl in KPKL131, als auch in KPKL135 Protease inaktive Formen von HtrA vorliegen, da trotz der erhöhten HtrA-Proteinmengen die PBP2x-Mengen in diesen Stämmen identisch mit der des Wildtypstamms *S. pneumoniae* R6 sind. Die Überprüfung von KPKL131 und KPKL135 mittels Sequenzierung offenbart in beiden Stämmen jeweils eine Mutation im Gen *htrA*, die wiederum zu einem AS-Austausch in der Proteasedomäne von HtrA führt (Tab. 3.4), was möglicherweise die Proteaseaktivität beeinflusst.

Im Stamm KPKL131 zeigte sich an der Position 703 von *htrA* ein Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin, der wiederum in einem AS-Austausch von Glycin zu Serin an der Position 235 von HtrA resultierte (Tab. 3.4). Demnach ist in diesem Fall die direkt benachbarte Aminosäure des aktiven Serins der katalytischen Triade von dem Austausch betroffen. Der Stamm KPKL135 weist einen Austausch von Adenin zu Guanin an der Position 361 von *htrA* auf. Dies führt zu einem AS-Austausch von Asparagin zu Asparaginsäure an der Position 121 von HtrA. Somit wird in dem Stamm KPKL135 die zweite Aminosäure vor dem Histidin der katalytischen Triade verändert.

In beiden Stämmen liegen die veränderten Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zu den Aminosäuren Serin bzw. Asparaginsäure der katalytischen Triade von HtrA und könnten dadurch einen negativen Einfluss auf die Proteaseaktivität von HtrA haben. Dies korreliert mit den gezeigten Ergebnissen hinsichtlich der nicht verringerten PBP2x-Mengen in diesen Stämmen (Abb. 3.22). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der zur Überexpression verwendete Promotor $P_{16S\ rRNA}$ vor *htrA* im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 zu stark ist, was wiederum zu Protease inhibierenden Mutationen in HtrA führt.

3.6.3 Komplementationsstudien von *htrA* im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae*

R6_{p_{bbp2x}C606}-T6

Um die Situation unabhängig von ihrem ursprünglichen genetischen Hintergrund in C606 zu untersuchen, wurde diese im definierten Hintergrund von R6 mit dem veränderten PBP2x aus C606 nachgestellt. Dafür wurden *htrA*-Komplementationsstudien in dem Stamm *S. pneumoniae* R6_{p_{bbp2x}C606}-T6, wie bereits beschrieben durchgeführt. Der Stamm *S. pneumoniae* R6_{p_{bbp2x}C606}-T6, der die vier AS-Austausche in PBP2x aus C606 beinhaltet, wurde das Gen *htrA* mittels Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009, Kap. 2.7.3.2) deletiert. Der erstellte *htrA*-Deletionsstamm KPKL4 diente als Ausgangsstamm für *htrA*-Komplementationsstudien.

Zur Erstellung des P_{*htrA*}-*htrA*-Komplementationsstamms KPKL41 wurde das Integrationsplasmid pKP01 verwendet. Sequenzierungsergebnisse bestätigten die Abwesenheit von Punktmutationen in dem Stamm KPKL41. P_{*vegM*}-*htrA*-Komplementationsstämme wurden durch Transformation von Ligationsansätze in den Stamm KPKL4 erzeugt. Eine korrekte Integration in das Genom wurde für alle erstellten Komplementationsstämme mittels Kultur-PCR belegt.

Sequenzierungsergebnisse der Stämme KPKL421 und KPKL423 offenbarten in beiden Fällen jeweils eine Punktmutation in *htrA*. Im Stamm KPKL421 liegt eine Substitution des Thymins an der Position 587 von *htrA* zu Cytosin vor. Dies führt zu dem AS-Austausch V196A, der in der Proteasedomäne von HtrA lokalisiert ist. Ebenfalls eine Substitution eines Thymins zu Cytosin, allerdings an der Position 563 von *htrA*, führt zu dem L188S-Austausch in der Proteasedomäne von HtrA von KPKL423.

Die Sequenzierung des Stamms KPKL424 zeigte ebenfalls eine Punktmutation in *htrA* und weiterhin eine Deletion des zweiten Thymins innerhalb der -35-Region von P_{*vegM*}. Die erwähnte Punktmutation in *htrA* führt dabei zu dem AS-Austausch Q37R. Demnach ist die vierte Aminosäure nach dem Transmembranbereich von HtrA in KPKL424 verändert. Die zwei P_{*vegM*}-*htrA*-Komplementationsstämme KPKL425 und KPKL422 wurden ebenfalls sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung offenbarten in KPKL425 eine Punktmutation in *htrA*, die zu den AS-Austauschen N283T und G284E in der Proteasedomäne und zu einem frühzeitigen Stopp nach AS 285 führten. Demnach fehlt dieser Transformante die komplette PDZ-Domäne und die letzte AS der Proteasedomäne. Des Weiteren wurde in KPKL425 eine Mutation im intergener Bereich zwischen *veg5* und P_{*vegM*} nachgewiesen (Tab. 3.5). Sequenzierungsergebnisse des Stamms KPKL422 zeigten ebenfalls eine Punktmutation in *htrA*, die zu dem V208A-Austausch in der Protease-Domäne von HtrA führt. In Tab. 3.5 sind die identifizierten Mutationen der beschriebenen P_{*vegM*}-*htrA*-Komplementationsstämme und die mit ihnen einhergehenden Auswirkungen auf AS-Ebene zusammengefasst.

Tab. 3.5: Übersicht der Mutationen in den P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6.

Stamm	Mutationen	AS-Austausch in HtrA
KPKL421	<i>htrA</i> T587C	V196A in der Proteasedomäne
KPKL422	<i>htrA</i> T623C	V208A in der Proteasedomäne
KPKL423	<i>htrA</i> T563C	L188S in der Proteasedomäne
KPKL424	Das zweite Nukleotid der -35 Region des P_{vegM} (T) fehlt.	
	<i>htrA</i> A110G	Q37R
KPKL425	Intergener Bereich zw. <i>veg5</i> und P_{vegM} : 64 bp stromaufwärts des P_{vegM} A→G	
	<i>htrA</i> A843 fehlt	N283T und G284E in der Proteasedomäne, Stopp nach AS 285: letzte AS der Proteasedomäne fehlt; PDZ-Domäne fehlt komplett

Von ausgewählten *htrA*-Komplementationsstämmen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 wurden Western-Blotanalysen mit α -HtrA- und α -PBP2x-Antikörpern durchgeführt, um zu überprüfen inwiefern sich die Mutationen auf die Proteinmengen und die Aktivität von HtrA auswirken. Die Ergebnisse sind der Abb. 3.23 zu entnehmen.

Wie erwartet konnte in den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL6 und KPKL4 kein HtrA detektiert werden. Die Labormutante C606 zeigt, wie bereits bekannt eine höhere HtrA-Proteinmenge bei ca. 45 kDa, bei ca. 35 kDa zwei Abbauprodukte und eine geringere PBP2x-Menge als im Wildtypstamm R6. *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 wies auf dem Western-Blotanalysen ebenfalls eine geringere PBP2x-Menge auf, allerdings war die PBP2x-Menge nicht so gering wie bei C606. In dem P_{htrA} -*htrA*-Komplementationsstamm KPKL41 konnte auch eine geringere PBP2x-Menge als im Wildtypstamm R6 nachgewiesen werden. Dabei war die detektierte PBP2x-Menge zwar genauso gering wie in dem Stamm *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6, erreichte jedoch die noch geringere Menge an PBP2x aus C606 nicht. Die nachgewiesene HtrA-Menge in KPKL41 ist mit der in R6 vergleichbar, was eine erfolgreiche Komplementation beweist. Demnach bekräftigen diese Ergebnisse, dass der native Promotor vor *htrA* und die Mutationen in PBP2x aus C606 nicht der alleinige Grund für die geringe PBP2x-Menge sind.

In den P_{vegM} -*htrA*-Komplementationstransformanten KPKL421 und KPKL423 konnte deutlich erhöhte HtrA-Mengen nachgewiesen werden, die den Proteinlevel an HtrA aus C606 erreichten. In beiden Stämmen wurde neben stärkeren HtrA-Banden bei ca. 45 kDa und einem stärkeren Abbauprodukt bei ca. 35 kDa, zusätzliche Banden bei ca. 55 kDa und 100 kDa auf dem Western-Blot mit α -HtrA-Antikörpern detektiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von HtrA aufgrund des stärkeren Promotors P_{vegM} funktioniert hat. Allerdings ist anhand des Western-Blots mit α -PBP2x-

Antikörpern anzunehmen, dass sowohl in KPKL421, als auch in KPKL423 Protease inaktive Formen von HtrA im überexprimierten Zustand vorliegen.

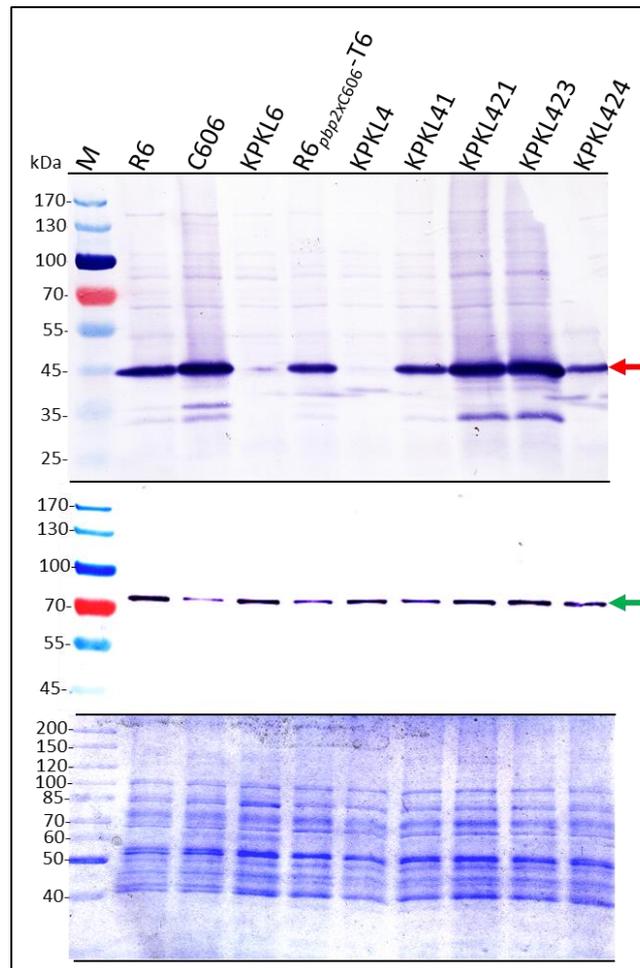


Abb. 3.23: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zellysate, die zuvor bei 37 °C bei einer Zelldichte von N 70 hergestellt wurden. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL6 (C606 Δ htrA), KPKL4 (R6_{pbp2xC606}-T6 Δ htrA), KPKL41 (KPKL4, P_{htrA}-htrA), KPKL421 (KPKL4, P_{vegM}-htrA, HtrA V196A), KPKL423 (KPKL4, P_{vegM}-htrA, HtrA L188S), KPKL424 (KPKL4, P_{vegM}-htrA, HtrA Q37R, weitere Mutationen siehe Tab. 3.5). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Zwei weitere 10 %ige SDS-Gele wurden ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA (Sebert *et al.*, 2005; 1:1.000; oben) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646; Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca. 45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 82 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

Denn trotz der erhöhten HtrA-Proteinmengen sind die PBP2x-Mengen in diesen Stämmen im Vergleich zum Wildtypstamm R6 nicht verringert. In beiden Stämmen ist es denkbar, dass die proteolytische Aktivität von HtrA aufgrund der vorliegenden Mutationen (Tab. 3.5) gehemmt werden könnte, was wiederum die unveränderte PBP2x-Menge in diesen Stämmen erklären würde. Anhand der Western-Blotanalysen wird deutlich, dass der Komplementationsstamm KPKL424 eine im Vergleich zu KPKL421 und KPKL423 geringere HtrA-Menge aufweist, die sogar etwas unterhalb der nachgewie-

senen HtrA-Proteinmenge in R6 liegt. Die detektierte PBP2x-Menge ist dabei mit der in R6 vergleichbar. In dem Stamm KPKL424 sind sicherlich die erwähnten Mutationen, vor allem die Mutation in der -35-Region des Promotors (Tab. 3.5), für die geringere HtrA-Proteinmenge in KPKL424 verantwortlich.

Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL4 wurde ein zweites Mal mit einem neu erstellten Ligationsansatz transformiert und Zellysate von 14 weiteren P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen wurden mittels Western-Blotanalysen mit α -HtrA- und α -PBP2x-Antikörpern untersucht (Daten nicht gezeigt). Anhand der Western-Blotanalysen konnten in sieben der Transformanten kein HtrA nachgewiesen werden. Eine der Transformanten zeigte dagegen lediglich ein kleineres Abbauprodukt von HtrA. Bei sechs der untersuchten Transformanten konnte HtrA in voller Länge nachgewiesen werden, allerdings waren die HtrA- und PBP2x-Mengen dieser Stämme unverändert zu den Mengen beider Proteine in R6. Die Ergebnisse beweisen eindeutig, dass im genetischen Hintergrund mit dem veränderten PBP2x aus C606 der verwendete Promotor P_{vegM} für die *htrA*-Komplementationsstudien zu stark ist. Dies führt in diesem genetischen Hintergrund ebenfalls zu Mutationen in *htrA* oder auch im Promotorbereich von P_{vegM} , die entweder die Proteinsynthese stoppen oder die Proteaseaktivität von HtrA inhibieren.

3.6.4 Komplementationsstudien von *htrA* im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6

Anhand von *htrA*-Komplementationen im genetischen Hintergrund von R6 konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt P_{vegM} -*htrA* funktionsfähig ist und die HtrA-Menge tatsächlich fast auf die in C405 detektierte Proteinmenge ansteigt (Abb. 3.20), wohingegen die PBP2x-Proteinmenge unverändert zu der im Wildtypstamm bleibt (Abb. 3.22).

Um die Situation im genetisch definierten Hintergrund mit dem veränderten PBP2x aus C405 nachzustellen, wurde in dem Stamm *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 zunächst das Gen *htrA* mittels Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009; Kap. 2.7.3.2) deletiert. Der so entstandene Stamm KPKL3 wurde als Ausgangsstamm für *htrA*-Komplementationsstudien verwendet. Um den Komplementationsstamm KPKL31 zu erstellen, wurde wie bereits in Kap. 3.6.2 beschrieben das Integrationsplasmid pKP01 verwendet, das vor dem *htrA* Gen den nativen Promotor beinhaltet. Zur Herstellung der P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen KPKL321-KPKL325 wurden zuvor erstellte Ligationsansätze in den Stamm KPKL3 transformiert. Mittels Kultur-PCR konnte für alle fünf Stämme eine korrekte Integration in das Genom bestätigt werden. Anhand von Sequenzierungsergebnissen wurde für den Stamm KPKL31 die Abwesenheit von Punktmutationen belegt. Die Sequenzierungsergebnisse von KPKL321 und KPKL325 offenbarten Punktmutationen in *htrA* (Tab. 3.6). Diese Mutationen führen zu einem frühzeitigen Stopp innerhalb von *htrA*, wodurch das Protein nicht vollständig synthetisiert werden kann.

Die Sequenzierergebnisse des Stamms KPKL321 zeigten eine Deletion des Thymins an der Position 66 von *htrA*. Dies führt wiederum zu acht AS-Austauschen innerhalb der Transmembranregion und zur Deletion der letzten drei Aminosäuren der Transmembrandomäne von HtrA. Des Weiteren führte die Deletion an Position 66 von *htrA* zu einem vorzeitigen Stopp der Proteinsynthese nach AS 31. Demnach fehlt dieser Transformante sowohl die Protease-, als auch die PDZ-Domäne von HtrA komplett. Anhand der Sequenzierergebnisse konnte auch eine Mutation im intergenen Bereich (Tab. 3.6) ausfindig gemacht werden, deren Auswirkung jedoch unbekannt ist. Für KPKL322 konnte anhand der Sequenzierung eine Substitution an Position 1138 und eine Insertion nach Position 848 von *htrA* nachgewiesen werden (Tab. 3.6). Diese Mutationen haben AS-Austausche in der Proteasedomäne und in der PDZ-Domäne zur Folge und bewirken ebenfalls einen Stopp nach Aminosäure 296 von HtrA. Dem Stamm fehlt ein Teil der PDZ-Domäne, da er nur die ersten zehn AS der PDZ-Domäne besitzt, wobei zusätzlich neun davon verändert sind. Zwei weitere P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen KPKL323 und KPKL324 wurden mittels Sequenzierung untersucht. KPKL323 zeigt eine Substitution an Position 305 von *htrA*, die zu dem E102G-Austausch in der Proteasedomäne führt. Die Transformante KPKL324 weist dagegen den L298S-Austausch in der PDZ-Domäne auf, der die Folge der Substitution des Thymins durch ein Cytosin an der Position 893 von *htrA* ist. Aufgrund der Deletion des Adenins an Position 14 von *htrA* in KPKL325 (Tab. 3.6), offenbart diese Transformante drei AS-Austausche vor der Transmembranregion von HtrA. Zusätzlich sind drei der ersten vier Aminosäuren der Transmembranregion von HtrA ebenfalls verändert und die Proteinsynthese stoppt bereits nach Aminosäure 14. Daher fehlen diesem Stamm die Proteasedomäne und die PDZ-Domäne von HtrA komplett. In Tab. 3.6 sind die identifizierten Mutationen der beschriebenen P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämme und die mit ihnen einhergehenden Auswirkungen auf AS-Ebene zusammengefasst.

Tab. 3.6: Übersicht der Mutationen in den P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6.

Stamm	Mutationen	AS-Austausch in HtrA
KPKL321	<i>htrA</i> T66 fehlt Intergener Bereich zwischen $\hat{veg5}$ und P_{vegM} : 16 bp stromabwärts des Stoppcodons von $\hat{veg5}$ A→G	F23L, S24V, G25E, A26P, L27W, G28V, S29V, S31Q ; Stopp nach AS 31
KPKL322	<i>htrA</i> A1138G, <i>htrA</i> nach 848 zusätzliches A	N283K, G284R, V286S: in der Proteasedomäne ; T287D, R288A, P289S, A290S, L291T, I293N, Q294P, M295D, V296G in der PDZ-Domäne ; Stopp nach AS 296
KPKL323	<i>htrA</i> A305G	E102G in der Proteasedomäne
KPKL324	<i>htrA</i> T893C	L298S in der PDZ-Domäne

Stamm	Mutationen	AS-Austausch in HtrA
KPKL325	<i>htrA</i> 14 (A) fehlt	T6H, Y8T, K10N: vor der Transmembrandomän; W11G, Q13N, L14Y: in der Transmembrandomäne, Stopp nach AS 14

Zellysate ausgewählter *htrA*-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von R6_{pbp2xC405}-T6 wurden mittels Western-Blotanalysen mit α -HtrA- und α -PBP2x-Antikörpern untersucht, wobei die Stämme R6, C405 und dessen *htrA*-Deletionsstamm KPKL5 als Kontrollen dienten. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.24 dargestellt.

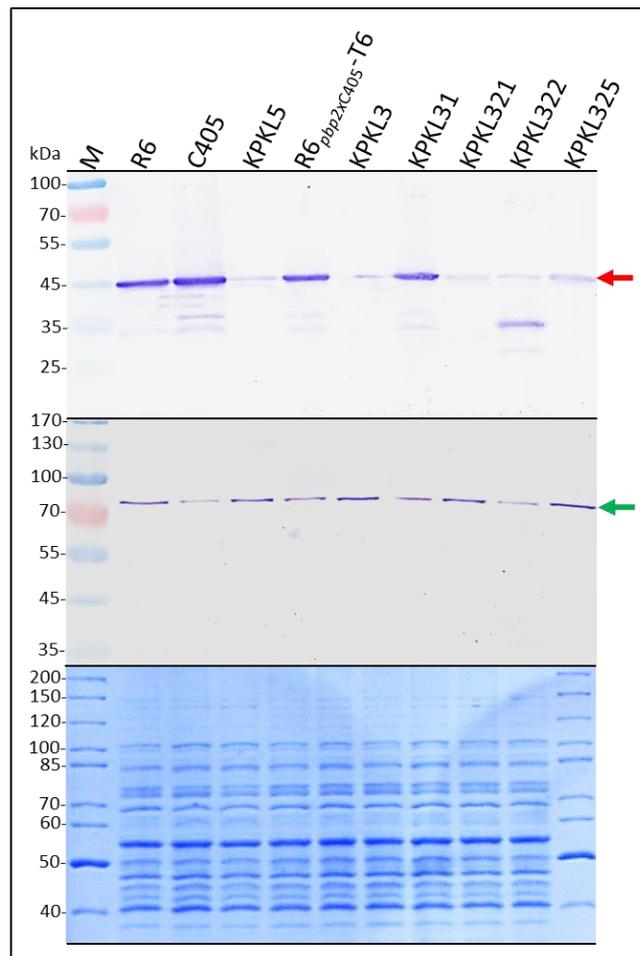


Abb. 3.24: Untersuchung der HtrA-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 mittels Western-Blotanalysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zellysate, die zuvor bei 37 °C bei einer Zelldichte von N 70 hergestellt wurden. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL5 (C405 Δ *htrA*), KPKL3 (R6_{pbp2xC405}-T6 Δ *htrA*), KPKL31 (KPKL3, P_{*htrA*}-*htrA*), KPKL321 (KPKL3, P_{*vegM*}-*htrA*, Mutationen und Stopp in HtrA), KPKL322 (KPKL3, P_{*vegM*}-*htrA*, Mutationen und Stopp in HtrA) siehe Tab. 3.6. Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Zwei weitere 10 %ige SDS-Gel wurden ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA 12003 (1:30.000; diese Arbeit; oben) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca. 45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 82 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

Der Stamm C405 weist, wie bereits bekannt, eine höhere HtrA- und eine geringere PBP2x-Menge auf. In *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 wird ebenfalls eine geringe PBP2x-Menge detektiert, allerdings erreicht dieser Stamm das geringe Niveau von C405 nicht. Wie erwartet wurde in den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL5 und KPKL3 kein HtrA detektiert. Beide Stämme weisen eine mit R6 vergleichbare PBP2x-Menge auf. Die HtrA-Menge des P_{htrA}-*htrA*-Komplementationsstamms KPKL31 korreliert mit der in R6 und beweist eine erfolgreiche Komplementation von *htrA*. Der Stamm KPKL31 lässt weiterhin eine geringere PBP2x-Menge erkennen, allerdings nicht so gering wie in C405. Die nachgewiesene PBP2x-Menge ist vielmehr mit der detektierten Menge in *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 vergleichbar. Die Stärke des nativen Promotors von *htrA* ist demnach nicht ausreichend, um im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 das geringe PBP2x Niveau des C405 zu erreichen. Dies stimmt mit den bisher vorliegenden Daten überein. Die P_{vegM}-*htrA*-Komplementationsstämme KPKL321, KPKL322 und KPKL325 wurden ebenfalls mittels Western-Blotanalysen untersucht. Bei den P_{vegM}-*htrA*-Komplementationsstämmen KPKL321 und KPKL325 kann HtrA, wenn überhaupt, bei ca. 45 kDa nur kaum detektiert werden und die nachgewiesenen PBP2x-Mengen sind identisch mit denen in R6.

Der Stamm KPKL322 weist interessanterweise eine geringe PBP2x-Menge auf und ein kleineres HtrA-Protein bei ca. 35 kDa mit einer Nebenbande bei ca. 25 kDa konnte nachgewiesen werden. Die detektierten HtrA-Mengen sind dabei schwächer als im Wildtypstamm R6. Die identifizierten Veränderungen in HtrA (Tab. 3.6) erklären die veränderte Größe der Serinprotease im Stamm KPKL322. Da die Proteasedomäne dieses Stamms in voller Länge vorliegt, scheint diese trotz der AS-Austausche N283K, G284R und V286S in der Proteasedomäne intakt zu sein, da das veränderte PBP2x aus C405 in diesem Stamm durch dieses mutierte HtrA abgebaut wird. Dies erklärt wiederum die geringere detektierte PBP2x-Menge in dem Stamm KPKL322. Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment mit unabhängigen Zellysaten bestätigt.

Die Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass HtrA nicht beliebig hoch in *S. pneumoniae* überexprimiert werden kann. Der für die *htrA*-Komplementationsstudien verwendete Promotor P_{vegM} ist im genetischen Hintergrund mit dem veränderten PBP2x aus C405 zu stark. Folglich kommt es in diesen Stämmen zu Mutationen in *htrA*. Die drei mittels Western-Blotanalysen untersuchten Transformanten zeigten dabei drastischere Mutationen, als die P_{16S rRNA}-*htrA*-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von R6 (s. Tab. 3.4 und Abb. 3.22). Diese führten zu Stoppcodons, die wiederum bewirkten, dass das jeweilige HtrA-Protein nur in verkürzter Form synthetisiert wurde.

3.6.5 Auswirkung der PBP2x-Mutationen und der *ciaH*-Allele auf die PBP2x-Menge

Die *htrA*-Komplementationsstudien mit dem stärkeren Promotor P_{vegM} im definierten genetischen Hintergrund mit den jeweils veränderten PBP2x aus C405 und C606 lieferten ausschließlich Transformanten mit Punktmutationen. Dies beweist, dass die Serinprotease HtrA nicht beliebig stark überexprimiert werden kann und die gewählten Promotoren P_{vegM} und $P_{16S\ rRNA}$ zu stark waren. Daher wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht die Expression von *htrA* in den Stämmen $R6_{pbp2xC606}$ -T6 und $R6_{pbp2xC405}$ -T6 zu steigern. Im Rahmen einer Masterarbeit (George, 2012) wurden deshalb zwei Expressionsvektoren mit induzierbaren Promotoren zunächst mit dem *htrA* Gen versehen und anschließend in den *htrA*-Deletionsstamm KPKL1 transformiert, um die Expression von *htrA* unabhängig von Zwei-Komponenten System CiaRH zu untersuchen (George, 2012). Phänotypische Untersuchungen, sowohl des LacI-regulierten Systems (pPB7, Oberhettinger, 2007), als auch des TetR-regulierten Systems (pTEX2, Helle *et al.*, 2011) zeigten in diesem Zusammenhang allerdings, dass keines der beiden getesteten induzierbaren Systeme die erhoffte Stärke der *htrA*-Expression erreichte (George, 2012).

Die Auswirkung der Kombinationen aus veränderten CiaH und verändertem PBP2x aus C405 und C606 auf die PBP2x-Menge sollten daher im definierten genetischen Hintergrund von R6 untersucht werden. Dafür wurde, unter Verwendung der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001), das *ciaH*-Wildtyp-Allel in den Stämmen *S. pneumoniae* $R6_{pbp2xC606}$ -T6 und *S. pneumoniae* $R6_{pbp2xC405}$ -T6, die bereits die jeweiligen Veränderungen in PBP2x beinhalten, durch das *ciaH306*-Allel aus C606 bzw. durch das *ciaH305*-Allel aus C405 ausgetauscht (Kap. 2.7.3.5). Zellysate dieser Stämme wurden im Anschluss anhand von Western-Blotanalysen auf veränderte PBP2x- und HtrA-Mengen hin untersucht.

3.6.5.1 Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C606 und des *ciaH306*-Allels auf die PBP2x-Menge

Durch den AS-Austausch des *ciaH306*-Allels kommt es bekanntlicherweise zu einer starken Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation (Giammarinaro *et al.*, 1999, Mascher *et al.*, 2003 Halfmann *et al.*, 2007b), da die Phosphataseaktivität von CiaH positiv beeinflusst wird (Guenzi *et al.*, 1994) und dies wiederum zu einer gesteigerten Phosphorylierung von CiaR führt. Die Promotoraktivität des Gens *htrA*, das für die Serinprotease HtrA kodiert, wird unter anderen ebenfalls auf eine sehr stark CiaR-abhängige Weise reguliert (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011). Daher sollte analysiert werden, inwiefern das *ciaH306*-Allel und die damit einhergehende Aktivierung der Promotoren der Zielgene des CiaR Regulons, bei dem Abbau von PBP2x aus C606 durch HtrA eine Rolle spielen.

Die Abb. 3.25 zeigt die Ergebnisse der Western-Blotanalysen zur Untersuchung der PBP2x-Mengen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* $R6_{pbp2xC606}$ -T6 mit dem *ciaH306*-Allel.

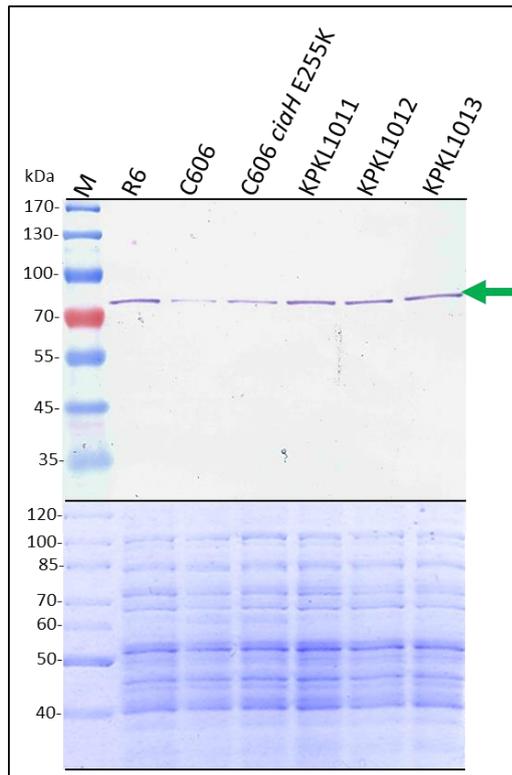


Abb. 3.25: Untersuchung der PBP2x-Mengen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 mit dem *ciaH306*-Allel. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zelllysate, die zuvor bei 37 °C bei einer Zelldichte von N 70 hergestellt wurden. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. KPKL1011 und KPKL1012 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V, CiaH T230P, E255K), KPKL1013 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V, CiaH T230P, CiaR G36T). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 3 µl der hergestellten Zelllysate aufgetragen. Nach einer Auftrennung durch eine 10 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 µl Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Ein weiteres 10 %ige SDS-Gel wurde ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 µl Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten PBP2x-Proteine (ca. 82 kDa, grüner Pfeil) sind markiert.

Der Stamm *S. pneumoniae* C606 weist eine im Vergleich zu R6 deutlich verringerte PBP2x-Menge auf. Die erstellten Stämme KPKL1011, 1012 und 1013 zeigen dagegen PBP2x-Mengen, die mit der in R6 übereinstimmen und nicht wie erwartet, verringert sind. Diese Stämme besitzen neben den vier AS-Austauschen aus C606 im PBP2x auch das erfolgreich eingebrachte *ciaH306*-Allel. Dies wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Des Weiteren konnte anhand der Sequenzdaten sowohl in KPKL1011, als auch in KPKL1012 eine zusätzliche Mutation in *ciaH* identifiziert werden, die zu dem E255K-Austausch in CiaH führt. Der Stamm KPKL1013 wies dagegen eine zusätzliche Mutation in *ciaR* auf, die den G36T-Austausch in CiaR hervorruft.

Diese zusätzlichen Missense-Mutationen in *ciaH* und *ciaR* sind neben der gewünschten *ciaH*-Mutation beim Einbringen des *ciaH306*-Allels in den Stamm R6_{pbp2xC606}-T6 aufgetreten. Die genetische Instabilität des *ciaH306*-Allels ist bereits beschrieben (Giammarinaro *et al.*, 1999; Müller *et al.* 2011). Die zusätzlichen kompensatorischen Mutationen führten zu einer Reduktion der CiaRH-vermittelten Genexpression; was wiederum mit der Wiederherstellung der Transformierbarkeit, der Erniedrigung der Resistenz gegenüber Cefotaxim und höheren Wachstumsraten einherging (Müller *et al.*, 2011).

Bei der in KPKL1011 und KPKL1012 zusätzlich aufgetretenen Mutation, die zu dem E255K-Austausch in CiaH führt, handelt es sich um eine solche kompensatorische Mutation. Die starke Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation, die auf das *ciaH306* zurückgeht, wird durch den E255K-Austausch in CiaH reprimiert. Dies führt dazu, dass das von CiaRH regulierte Gen *htrA* in geringeren Mengen exprimiert wird und daher das veränderte PBP2x aus C606 nicht abgebaut wird (Abb. 3.25).

Zusätzlich zu dem Stamm C606 wurde auch eine mutierte Variante dieses Stammes aufgetragen, die ebenfalls den AS-Austausch E255K in CiaH beinhaltet. Die detektierte PBP2x-Menge des C606 Stammes mit E255K in CiaH ist dabei im Vergleich zu C606 erhöht, erreicht allerdings nicht die PBP2x-Menge in R6. Auch hier wird *htrA* aufgrund der kompensatorischen Mutation im Vergleich zu C606 in geringeren Mengen exprimiert und kann daher das veränderte PBP2x aus C606 nicht in dem Maße abbauen, wie dies in C606 der Fall ist.

Hinsichtlich der Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C606 und des *ciaH306*-Allels auf die PBP2x-Menge konnten anhand der durchgeführten Experimente keine Aussagen getroffen werden, da das *ciaH306* eine hohe genetische Instabilität aufwies und somit die praktische Arbeit erschwerte. Weiterführende Experimente wurden daher im genetisch stabileren Stamm C405 durchgeführt.

3.6.5.2 Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C405 und des *ciaH305*-Allels auf die PBP2x-Menge

Es ist bekannt, dass das *ciaH305*-Allel eine moderate, ca. 5fache Erhöhung der Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoren im Vergleich zum Wildtyp bewirkt (Müller *et al.*, 2011). Zu diesen Promotoren zählt, wie bereits erwähnt, auch der Promotor von *htrA*. Um diese erhöhte Aktivität von P_{htrA} auch in dem Stamm $R6_{pbp2xC405}$ -T6 zu erreichen, wurde das *ciaH305*-Allel im Rahmen eines Forschungspraktikums mittels Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) in diesen eingefügt (Heß, 2012). Nachdem der erfolgreiche Austausch durch Sequenzierungsergebnisse bestätigt worden war, wurden die HtrA und PBP2x-Mengen der Zelllysaten dieser Stämme mittels Western-Blotanalysen untersucht. Die Ergebnisse sind der Abb. 3.26 zu entnehmen.

Die Western-Blotexperimente mit dem α -HtrA 12003 (diese Arbeit) Antikörper zeigen für die Stämme KPKL2011 T1 und T2 eine, im Vergleich zu R6, erhöhte HtrA-Menge, was die erfolgreich erhöhte Promotoraktivität von P_{htrA} anzeigt. Dies wird vor allem an den größeren Mengen des Abbauproduktes bei ca. 35 kDa deutlich. Die HtrA-Mengen der beiden KPKL2011 Stämme sind dabei identisch mit der ebenfalls erhöhten HtrA-Menge in C405 (Abb. 3.26). Aufgrund der gesteigerten Mengen der Serinprotease HtrA wird in beiden Stämmen das mutierte PBP2x, das die AS-Austausche L403F und T526S beinhaltet, vermehrt abgebaut. Die detektierten PBP2x-Mengen sind dabei genauso gering wie in dem Laborstamm C405.

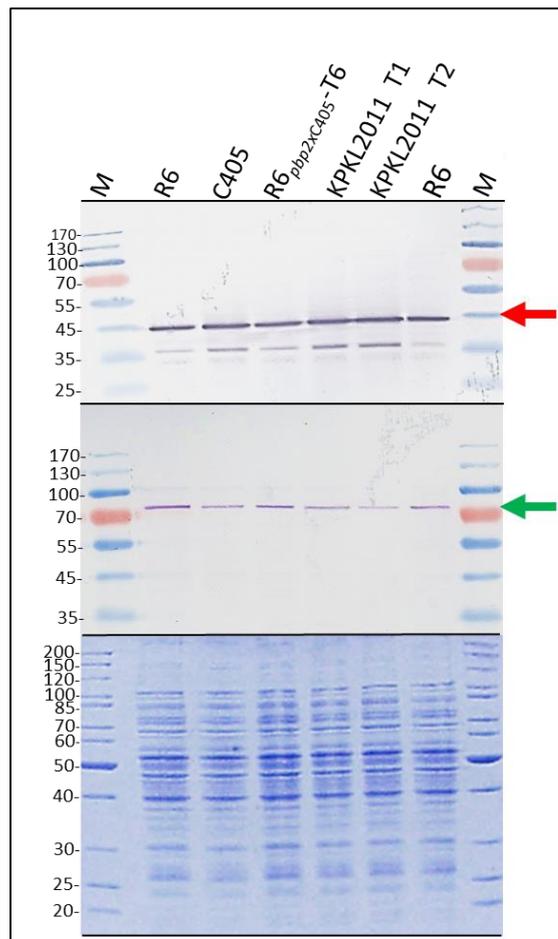


Abb. 3.26: Untersuchung der PBP2x- und HtrA-Mengen im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 mit dem *ciaH305*-Allel. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S), KLKP2011 T1 und T2 (R6, PBP2x L403F, T526S, CiaH H95D). Unten: Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 3 µl der hergestellten Zellysate aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 µl Proteinmarker II (PeqLab). Zwei weitere 12,5 %ige SDS-Gel wurden ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA 12003 (1:30.000; diese Arbeit; oben) bzw. mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 µl Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten HtrA- (ca.45 kDa, roter Pfeil) bzw. PBP2x- (ca. 82 kDa, grüner Pfeil) Proteine sind markiert.

Durch die Nachstellung im genetisch definierten Hintergrund konnte bereits eindeutig bewiesen werden, dass die beiden Mutationen L403F und T526S in PBP2x einen Abbau durch HtrA begünstigen (Kap. 3.2) und dass die erhöhte Menge an HtrA, die auf das *ciaH305*-Allel zurückzuführen ist, ausreichen um das veränderte PBP2x aus C405 in dem gleichen Maße abzubauen, wie dies in der Labormutante der Fall ist. Diese Ergebnisse schließen somit eine weitere, möglicherweise noch unbekannte Komponente, die neben den AS-Austauschen L403F und T526S in PBP2x und dem *ciaH305*-Allel für den Abbau des veränderten PBP2x durch die Serinprotease HtrA in C405 verantwortlich ist, aus.

3.7 Charakterisierung von HtrA mittels Wachstumsanalysen und MHK

In den folgenden Experimenten wurde die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* näher charakterisiert. Um zu klären, ob die Inaktivierung von *htrA* in dem Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 zu einer Temperatursensitivität gegenüber hohen Temperaturen führt, wurden Wachstumsanalysen mit einem Temperaturshift durchgeführt. Weiterhin wurden das Wachstumsverhalten und die Morphologie von *htrA*-Deletionsstämmen und *htrA*_{S234A}-Komplementationsstämmen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen untersucht. Anhand der Ergebnisse wurde ermittelt, wie gut die untersuchten Stämme Hitzestress tolerieren können und inwiefern sich das Fehlen der kompletten Serinprotease HtrA bzw. der Proteasefunktion von HtrA auf die Morphologie und das Wachstum bei 30 °C, 37 °C und 42 °C auswirkt.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Serinprotease HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz in dem Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6, den Stämmen R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6, die jeweils ein verändertes PBP2x aus C405 bzw. C606 beinhalten und dem Laborstamm C405 mittels Agardilutionstests, sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C untersucht.

3.7.1 Wachstumsanalysen und Studien der Zellmorphologie zur Untersuchung der Temperatursensitivität von HtrA

Die Serinprotease HtrA spielt bekanntlich eine entscheidende Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle. Weiterhin besitzt HtrA sowohl Chaperon-, als auch Proteaseaktivität, wobei diese bei niedrigeren Temperaturen als Chaperon und bei höheren Temperaturen eher als Protease fungiert (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Spiess *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002). Die Inaktivierung der extrazellulären Protease HtrA_{Li} aus *Lactococcus lactis* führt beispielsweise während des Wachstums bei sehr hohen Temperaturen zu einer Temperatursensitivität. Somit konnte anhand von Temperaturshiftexperimenten gezeigt werden, dass HtrA_{Li} bei Temperaturen über 37 °C essentiell ist (Poquet *et al.*, 2000).

Untersuchung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* R6

Um zu klären, ob HtrA aus *S. pneumoniae* ebenfalls eine Temperatursensitivität aufweist, wurden Wachstumsanalysen und morphologische Studien des Wildtypstamms *S. pneumoniae* R6, des *htrA*-Deletionsstamms KPKL1 und des *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms KPKL14 durchgeführt. Dabei wurden pro Stamm jeweils drei gleich behandelte Proben und bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 10-16 inkubiert. Eine der Proben diente zur Kontrolle und wurde weiter bei 30 °C inkubiert; wohingegen mit den anderen beiden ein Temperaturshift auf 37 °C bzw. 41 °C durchgeführt wurde (Kap. 2.6.3.1). In Abb. 3.27 sind die Ergebnisse der Wachstums- und Zellmorphologieanalysen von *S. pneumoniae* R6, KPKL1 und KPKL14 nach einer Veränderung der Wachstumstemperatur auf 37 °C und 41 °C gezeigt.

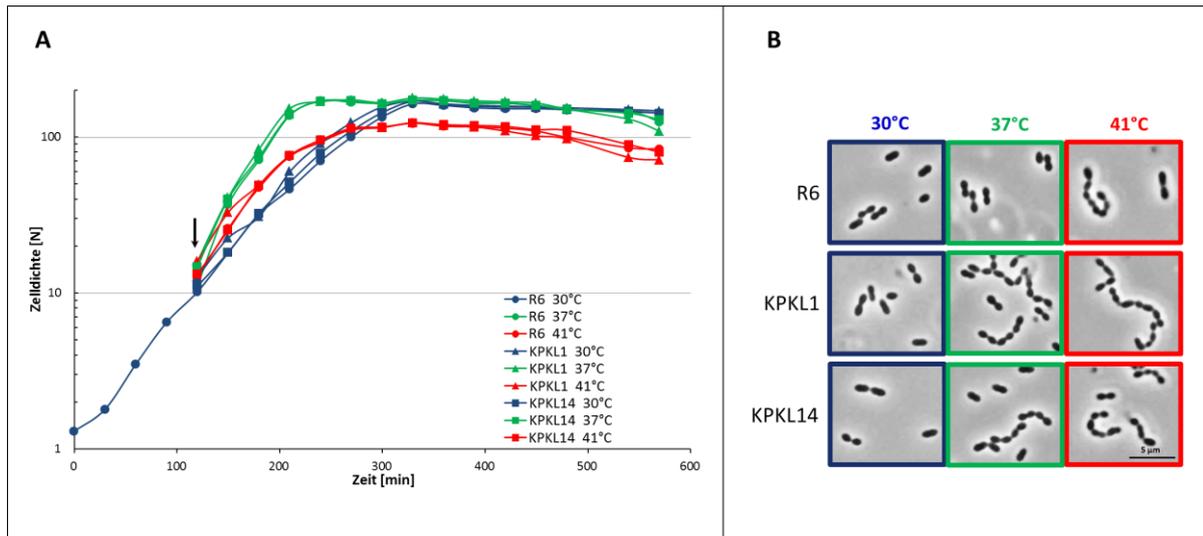


Abb. 3.27: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* R6. **A:** Wachstumskurven mit Temperaturshift von *S. pneumoniae* KPKL1 (R6 $\Delta htrA$, Dreieck), KPKL14 (R6 $\Delta htrA htrA_{S234A}$, Quadrat) und dem Stamm R6 (Kreis). Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium bis zu einer Zelldichte von N 10-16 bei 30 °C wachsen gelassen und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. \downarrow : Zeitpunkt des Temperaturshifts. Das Wachstum bei 30 °C ist in blau, bei 37 °C in grün und bei 41 °C in rot dargestellt. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL1 und KPKL14 im Vergleich zu R6 bei 30 °C (blau), bei 37 °C (grün) und bei 41 °C (rot). Pro Temperatur und Stamm ist jeweils eine mikroskopische Aufnahme gezeigt. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstab (5 µm) ist unten rechts dargestellt.

Bei 30 °C weisen die drei untersuchten Stämme keine Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie auf. Die Stämme erreichen gleichzeitig nach 330 min die stationäre Phase, bleiben die nächsten 4 h stationär und wachsen in typischen Diplokokken. Nach dem Temperaturshift auf 37 °C wachsen KPKL1, KPKL14 und R6 schneller als zuvor bei 30 °C und erreichen nach ca. 240 min die stationäre Phase. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL1 weist im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 und zu KPKL14 bei 37 °C eine leicht verkürzte stationäre Phase auf (bereits gezeigt: Kap. 3.6.2.1 und Abb. 3.21 B). Zudem verfügen sowohl KPKL1, als auch KPKL14, neben Diplokokken, auch über Zellen mit längeren Ketten. *S. pneumoniae* R6 wächst dagegen ausschließlich in Diplokokken. Dies spricht dafür, dass das Ausschalten der Serinprotease in *S. pneumoniae* R6 bzw. das Ausschalten der Proteaseaktivität von HtrA das Wachstum und die Morphologie bei 37 °C möglicherweise minimal negativ beeinflusst.

Sobald die Kulturen auf Wachstum bei 41 °C verlagert wurden, wuchsen sie wesentlich langsamer und erreichten eine deutlich geringere Zelldichte als bei 30 °C bzw. 37 °C. Die Analyse der Morphologie der Zellen von KPKL1, KPKL14 und R6, die bei 41 °C gewachsen sind, offenbarten keinerlei Unterschiede. In allen drei Stämmen wuchsen die Zellen in längeren Ketten, wobei die einzelnen Kokken innerhalb einer Kette nicht immer gleich groß waren. Für *S. pneumoniae* Zellen liegt die Wachstumstemperaturtoleranz bei 42 °C; somit war das Wachstum bei 41 °C bereits mit Zellstress verbunden und erklärt die leicht veränderte Morphologie. Die Ergebnisse zeigen an, dass das Fehlen der Serinprotease

HtrA bzw. der Proteaseaktivität von HtrA das Wachstum und die Morphologie nicht wirklich beeinträchtigen; demnach ist die Serinprotease HtrA in *S. pneumoniae* R6 nicht temperatursensitiv.

Untersuchung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* R6 mit verändertem PBP2x aus C405 und C606

Darüber hinaus wurde eine mögliche Temperatursensitivität von HtrA in Stämmen mit jeweils verändertem PBP2x aus C405 bzw C606 mittels Wachstumsanalysen mit Temperaturshift überprüft. In den Stämmen R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 wurde bereits ein Abbau des jeweils veränderten PBP2x durch die Serinprotease HtrA nachgewiesen, der vermutlich auf die falsche Faltung dieser Proteine zurückzuführen ist. In Abb. 3.28 sind die Ergebnisse für den Stamm R6_{pbp2xC405}-T6 und den *htrA*-Deletionsstamm KPKL3 zu finden.

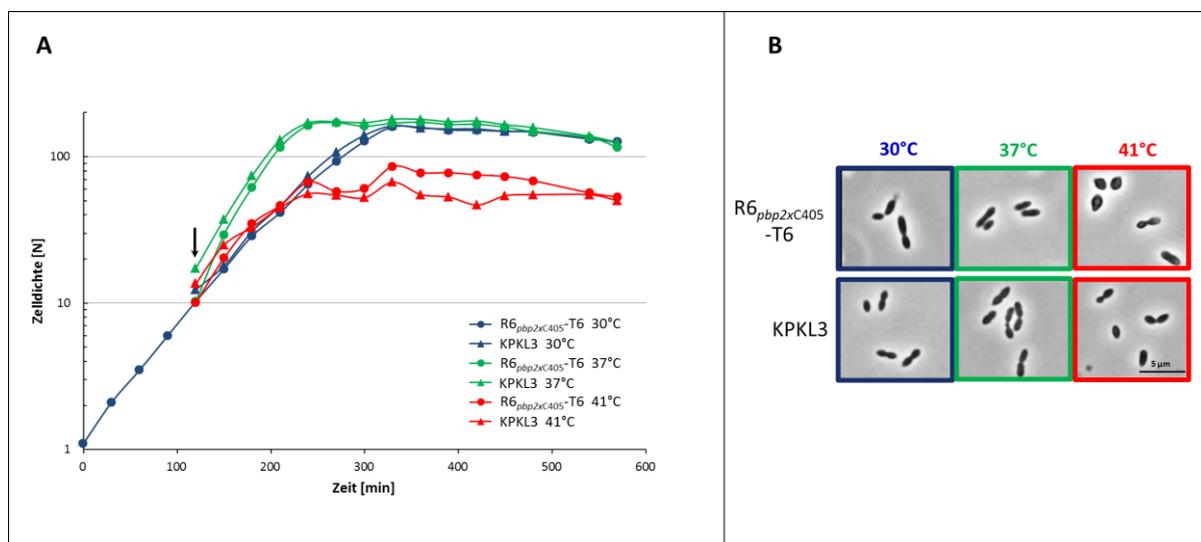


Abb. 3.28: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* R6 mit verändertem PBP2x aus C405. **A:** Wachstumskurven mit Temperaturshift von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S, Kreis) und KPKL3 (R6, PBP2x L403F, T526S $\Delta htrA$, Dreieck). Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden bei 30 °C in C-Medium bis zu einer Zelldichte von N 10-16 wachsen gelassen und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. ↓: Zeitpunkt des Temperaturshifts. Das Wachstum bei 30 °C ist in blau, bei 37 °C in grün und bei 41 °C in rot dargestellt. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 und KPKL3 bei 30 °C (blau), bei 37 °C (grün) und bei 41 °C (rot). Pro Temperatur und Stamm ist jeweils eine mikroskopische Aufnahme gezeigt. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstab (5 μ m) ist unten rechts dargestellt.

Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme ist bei 30 °C und bei 37 °C identisch. Unterschiede zeigen sich jedoch in der Morphologie der Zellen. Die Morphologie der R6_{pbp2xC405}-T6 Zellen ist gekennzeichnet durch deutlich verlängerte Zellen, was auf die AS-Austausche in dem veränderten PBP2x zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis wurde bereits im Kap. 3.4 und Abb. 3.16 erörtert. Der Deletionsstamm KPKL3 weist dagegen Zellen mit normaler Größe auf. Das bedeutet, dass der Effekt der longitudinal verlängerten Zellen, der auf die PBP2x-Veränderungen aus C405 zurückgeführt werden konnte, durch die Deletion von *htrA* aufgehoben wird. Auch bei 37 °C scheinen die Zellen von

R6_{pbp2xC405}-T6 leicht länglich verformt zu sein, wohingegen der Deletionsstamm erneut eine normalere Morphologie an den Tag legt.

Sobald die beiden Stämme bei 41 °C weiter inkubiert wurden, war zu erkennen, dass der KPKL3 im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T6 einen Wachstumsnachteil aufwies. Dies korreliert mit dem Ergebnis der Zellmorphologie bei 41 °C. R6_{pbp2xC405}-T6-Zellen fielen aufgrund ihrer verkürzten und gerundeten Morphologie der Zellen auf. Sobald die Serinprotease HtrA fehlte, zeigten sich Zellmorphologien, die dem Wildtypstamm R6 in Größe und Form eher ähnelten. Die Ergebnisse demonstrieren, dass das Fehlen von HtrA bei allen untersuchten Temperaturen und vor allem bei 41 °C die Zellmorphologie positiv beeinflusst.

Eine mögliche Temperatursensitivität von HtrA in dem Stamm, der das veränderte PBP2x aus C606 enthält, wurde ebenfalls mittels Wachstumsanalysen mit Temperaturshift überprüft. Die Abb. 3.29 veranschaulicht die Ergebnisse der Wachstumsanalysen mit Temperaturshift und die Untersuchungen zur Zellmorphologie für den Stamm R6_{pbp2xC606}-T6 und den *htrA*-Deletionsstamm KPKL4.

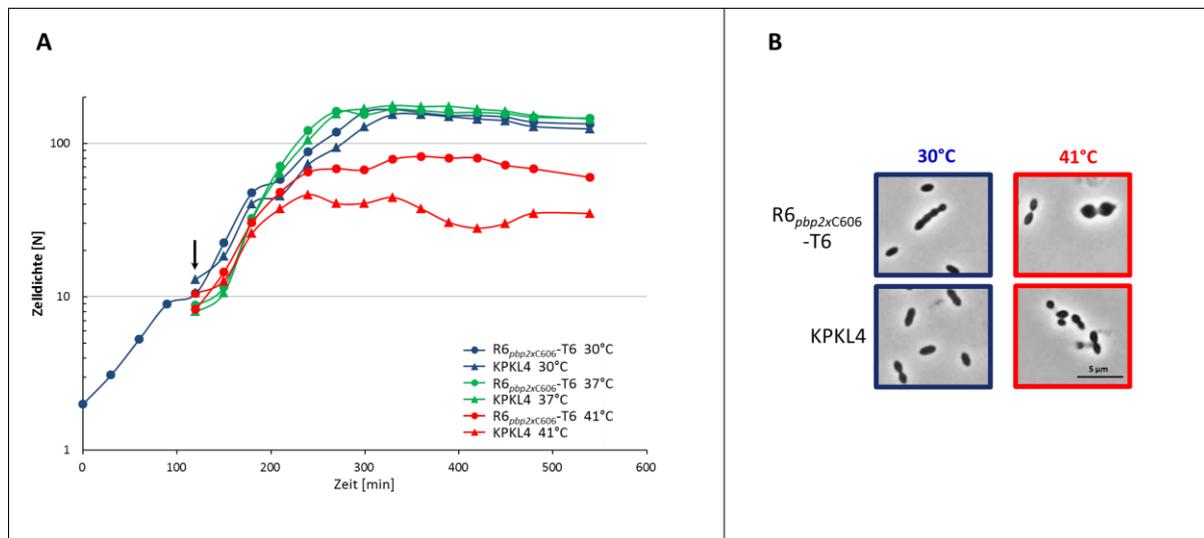


Abb. 3.29: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* R6 mit verändertem PBP2x aus C606. **A:** Wachstumskurven mit Temperaturshift von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V) (Kreis) und KPKL4 (R6 PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V Δ *htrA*) (Dreieck). Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium bis zu einer Zelldichte von N 10-16 bei 30 °C wachsen gelassen und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. ↓: Zeitpunkt des Temperaturshifts. Das Wachstum bei 30 °C ist in blau, bei 37 °C in grün und bei 41 °C in rot dargestellt. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 und KPKL4 bei 30 °C (blau) und bei 41 °C (rot). Pro Temperatur und Stamm ist jeweils eine mikroskopische Aufnahme gezeigt. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstab (5 μ m) ist unten rechts dargestellt.

Bei der Inkubation der beiden Stämme bei 37 °C zeigten sich keine Unterschiede im Wachstumsverhalten. Bei 30 °C wuchs der *htrA*-Deletionsstamm KPKL4 im Vergleich zu R6_{pbp2xC606}-T6 etwas langsamer. Die Morphologie der R6_{pbp2xC606}-T6-Zellen war bei 30 °C deutlich verändert. Die Zellen waren teilweise sehr klein, oder zeigten noch deutlicher als bereits für R6_{pbp2xC405}-T6 beschrieben, stark verlängerte Zellen. Im Stamm KPKL4 fand dagegen aufgrund der Deletion von HtrA eine Erholung der Zellmorphologie statt. Ein prägnanter Unterschied wird bei der Betrachtung des Wachstums der bei-

den Stämme bei 41 °C sichtbar. Der Stamm KPKL4 weist im Vergleich zu R6_{pbp2xC606}-T6 einen deutlichen Wachstumsdefekt auf, da er bei weitem nicht die gleiche Zelldichte erreicht und bereits bei einer Zelldichte von N 40 in die stationäre Phase übergeht. Die Zellmorphologie von R6_{pbp2xC606}-T6 und KPKL4 demonstriert drastische Unterschiede. R6_{pbp2xC606}-T6-Zellen besitzen eine ähnliche Morphologie wie R6_{pbp2xC405}-T6-Zellen bei 41 °C, allerdings sind sie noch geschwollener und runder. Der Stamm KPKL4 weist im Verhältnis dazu sehr kleine Zellen auf.

Diese Daten belegen, dass auch im Fall von R6_{pbp2xC606}-T6 durch das Fehlen von HtrA bei 30 °C und bei 41 °C die Zellmorphologie positiv beeinflusst wird, allerdings noch deutlicher, als dies bereits bei R6_{pbp2xC405}-T6 der Fall ist. Der Unterschied im Wachstumsverhalten bei 41 °C ist ebenfalls wesentlich greifbarer, als dies im Fall des veränderten PBP2x aus C606 der Fall ist. Dies korreliert mit der Tatsache, dass das PBP2x aus C606 mehr Veränderungen beinhaltet als das PBP2x aus C405.

Untersuchung der Temperatursensitivität von HtrA in den Laborstämmen *S. pneumoniae* C405 und C606

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Deletion von *htrA* und die anschließende Komplementation mit der Protease-inaktiven Form (S234A) von HtrA in der Labormutante C405 auf die gleiche Art und Weise untersucht. In Abb. 3.30 ist das Wachstum und die Zellmorphologie von *S. pneumoniae* C405, KPKL5 und KPKL51 nach einer Veränderung der Wachstumstemperatur auf 37 °C und 41 °C zu sehen.

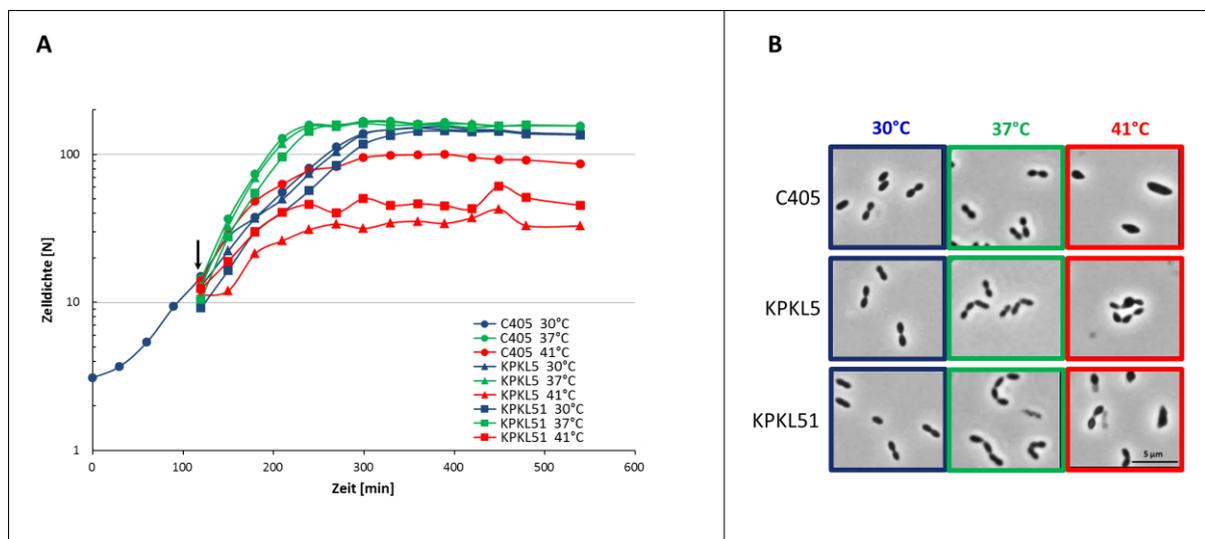


Abb. 3.30: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* C405. **A:** Wachstumskurven mit Temperaturshift von *S. pneumoniae* KPKL5 (C405 $\Delta htrA$, Dreieck), KPKL51 (C405 $\Delta htrA htrA_{S234A}$, Quadrat) und dem Stamm C405 (Kreis). Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden bei 30 °C in C-Medium bis zu einer Zelldichte von N 10-16 wachsen gelassen und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. \downarrow : Zeitpunkt des Temperaturshifts. Das Wachstum bei 30 °C ist in blau, bei 37 °C in grün und bei 41 °C in rot dargestellt. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL5 und KPKL51 im Vergleich zu C405 bei 30 °C (blau), bei 37 °C (grün) und bei 41 °C (rot). Pro Temperatur und Stamm ist jeweils eine mikroskopische Aufnahme gezeigt. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstab (5 μ m) ist unten rechts dargestellt.

Der Stamm C405, der *htrA*-Deletionsstamm KPKL5 und der *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm KPKL51 wuchsen bei 30 °C nahezu gleich gut; lediglich der Stamm KPKL51 war etwas langsamer. Nach ca. 300 min erreichten die Stämme die stationäre Phase und blieben stationär. Die Untersuchung der Zellmorphologie brachte keine Unterschiede zu Tage; vielmehr besaßen alle drei Stämme eine normale Diplokokken Morphologie. Auch bei Inkubation der Stämme bei 37 °C zeigten sich weder morphologische Unterschiede, noch Änderungen im Wachstumsverhalten. Dagegen führte das Wachstum nach dem Temperaturshift auf 41 °C zu einer deutlichen Änderung des Wachstumsverhaltens und zu einer stark deformierten Zellmorphologie in allen drei Stämmen. Der Laborstamm zeigte die beste Anpassung an das Wachstum bei 41 °C; er erreichte eine maximale Zelldichte von 100 N und blieb stationär. Die Zellen von C405 wiesen bei 41 °C eine kantige Zellmorphologie auf, die keinerlei Einschnürungen am Zellseptum zeigten. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL5, der weder Protease-, noch Chaperonfunktion der Serinprotease HtrA besaß, zeigte bei 41 °C den größten Wachstumsdefekt. Falsch gefaltete und degradierte Proteine können aufgrund des Fehlens von HtrA nicht abgebaut werden; zusätzlich werden Proteine nicht geschützt, da auch die Chaperonfunktion von HtrA fehlt. Die Zellmorphologie zeigt 3-4 Zellen mit unterschiedlicher Größe, die in Ketten zusammengelagert sind. Der *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm KPKL51 verfügt bei 41 °C ebenfalls über einen Wachstumsdefekt, der allerdings eindeutig geringer ausgeprägt ist, als im Stamm KPKL5. Die vorhandene Chaperonfunktion in diesem Stamm wirkt sich demnach positiv auf das Wachstum bei 41 °C aus, was sich in der leichten Erholung der Zellmorphologie bemerkbar macht. Demnach ist HtrA im genetischen Hintergrund von C405 temperatursensitiv.

Die Auswirkung der Deletion von *htrA* und die anschließende Komplementation mit *htrA*_{S234A} wurden in der Labormutante C606 ebenfalls analysiert. Die Ergebnisse sind der Abb. 3.31 zu entnehmen.

Bei 30 °C zeigen KPKL6 und vor allem C606 bereits nach 2,5 h stationärer Phase eine früher eintretende Lyse. Der Stamm KPKL61, der Chaperonfunktion von HtrA besitzt, weist eine etwas längere stationäre Wachstumsphase auf. Bezüglich der Morphologie der Zellen zeigen sich keine Unterschiede bei 30 °C. Die drei untersuchten Stämme weisen keinerlei Unterschiede beim Wachstum und in der Morphologie (Daten nicht gezeigt) bei 37 °C auf. bei der Inkubation der Stämme bei 41 °C ist kein deutlicher Effekt auf das Wachstumsverhalten der drei Stämme zu erkennen. Der *htrA*-Deletionsstamm und der *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm weisen allerdings eine höhere Zelldichte auf als die Labormutante C606. Demnach könnte vermutet werden, dass das Fehlen der Proteasefunktion von HtrA das Wachstumsverhalten von C606 sogar leicht positiv beeinflusst. Die phasenmikroskopischen Bilder offenbaren deutliche Verformungen bei 41 °C in allen drei Stämmen.

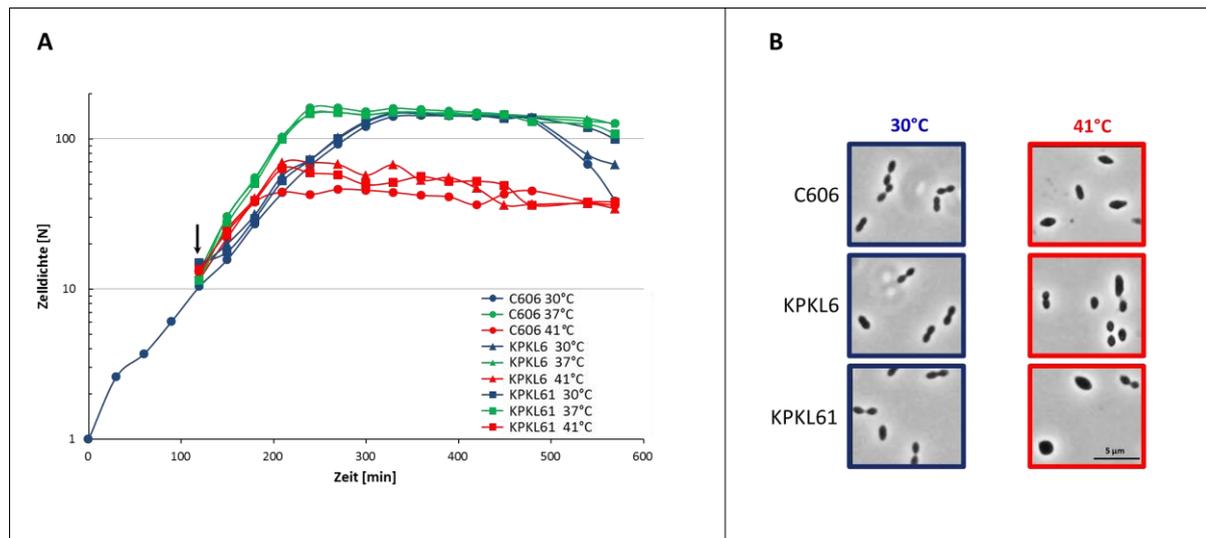


Abb. 3.31: Überprüfung der Temperatursensitivität von HtrA in *S. pneumoniae* C606. **A:** Wachstumskurven mit Temperaturshift von *S. pneumoniae* KPKL6 (C606 Δ htrA, Dreieck), KPKL61 (C606 Δ htrA htrA_{S234A}, Quadrat) und dem Stamm C606 (Kreis). Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 10-16 wachsen gelassen und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. ↓: Zeitpunkt des Temperaturshifts. Das Wachstum bei 30 °C ist in blau, bei 37 °C in grün und bei 41 °C in rot dargestellt. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL6 und KPKL61 im Vergleich zu C606 bei 30 °C (blau) und bei 41 °C (rot). Pro Temperatur und Stamm ist jeweils eine mikroskopische Aufnahme gezeigt. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstab (5 µm) ist unten rechts dargestellt.

3.7.2 Der Einfluss der Serinprotease HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz

Für die Stämme *S. pneumoniae* C405, C606, R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 wurde ein Abbau des jeweils veränderten PBP2x durch die Serinprotease HtrA sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C bewiesen (C405 und C606: Kap. 3.1.1, R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6: Kap. 3.3). Die Deletion des *htrA* Gens führt bei allen vier Stämmen zu einer nachweislich erhöhten Menge des jeweils veränderten PBP2x, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist (C405 und C606: Kap. 3.1.1, R6_{pbp2xC405}-T6: Kap. 3.6.4, R6_{pbp2xC606}-T6: Kap. 3.6.3). Demnach besitzen diese Stämme nach der Deletion von *htrA* mehr mutiertes PBP2x, welches wiederum für die Cefotaxim-Resistenz dieser Stämme verantwortlich ist. Innerhalb mehrerer Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer Erhöhung der MHK kommen kann, wenn mehr mutiertes PBP-Protein vorhanden ist, da in diesem Fall für die Inhibition des Wachstums auch mehr β -Laktamantibiotika benötigt wird (Fontana *et al.*, 1983; Giles und Reynolds, 1979).

In *Pseudomonas aeruginosa* belegen zahlreiche Studien des Weiteren eine Beteiligung der ATP-abhängigen Proteasen Lon und AsrA an der Antibiotikaresistenz dieses Gram-negativen Bakteriums (Brazas *et al.*, 2007; Breidenstein *et al.*, 2008; Kindrachuk *et al.*, 2011). Darüber hinaus beeinträchtigen die drei Proteine PfpI, ClpS und ClpP, die mit Proteasen verwandt sind, unter anderem ebenfalls die Antibiotikaresistenz. Dies wurde bei einem Screenings von Mutanten, die eine Störung in den jeweiligen Genen dieser Proteasen aufwiesen, festgestellt (Fernández *et al.*, 2012).

Aus diesem Grund wurde ein möglicher Einfluss von HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz mit Hilfe des Agardilutionstests (Kap. 2.6.5) in diesen Stämmen sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C untersucht. In Abb. 3.32 A sind die ermittelten Cefotaxim-Resistenzen der Stämme *S. pneumoniae* R6, KPKL1 und KPKL14 bei 37 °C dargestellt; Abb. 3.32 B zeigt die Ergebnisse bei 30 °C.

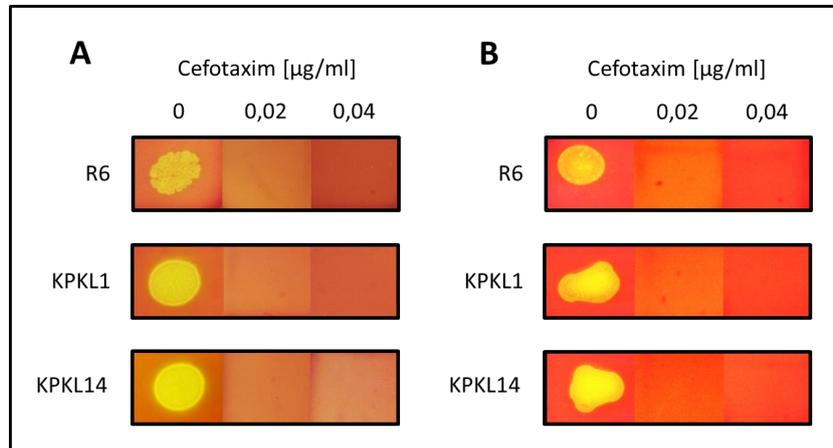


Abb. 3.32: Resistenz von *S. pneumoniae* R6, KPKL1 und KPKL14 gegen das β-Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C (A) und bei 30 °C (B). Die Abbildungen zeigen die MHK-Werte der Stämme R6, KPKL1 (R6 $\Delta htrA$) und KPKL14 (R6 $\Delta htrA htrA_{S234A}$), die mit Hilfe der Agardilutionsmethode ermittelt wurden. Die Cefotaximkonzentration ist in µg/ml angegeben und von links nach rechts ansteigend dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentration erfolgte in 0,02er [µg/ml] Schritten. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen in C-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 30 inkubiert. Das Wachstum zeigt sich auf den D-Blutagarplatten durch die vergrünende α-Hämolyse der Bakterien.

Den in Abb. 3.32 gezeigten Ergebnissen zufolge, wirkt sich die Deletion des *htrA* Gens mittels Che-shire-Kassette (KPKL1, Kap. 2.7.3.2) im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 bei beiden getesteten Temperaturen nicht auf die Cefotaxim-Resistenz aus. Auch die Komplementation dieses *htrA*-Deletionsstamms mit einer Protease-inaktiven Form von *htrA* zeigt keinen Einfluss auf die Cefotaxim-Resistenz. Alle drei getesteten Stämme wuchsen bei beiden Temperaturen auf D-Blutagarplatten mit 0,02 µg/ml Cefotaxim nicht mehr. Demnach scheint weder die Protease- noch die Chaperonfunktion von HtrA für die Cefotaxim-Resistenz im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 von Bedeutung zu sein.

Um den Einfluss der Serinprotease HtrA auf die Cefotaxim-Resistenz im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* C405 zu untersuchen, wurde die MHK von C405, von dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL5 und von dem *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm KPKL51 bei 30 °C und bei 37 °C bestimmt. Die Ergebnisse sind der Abb. 3.33 zu entnehmen.

Die Cefotaxim-Resistenz des Stamms *S. pneumoniae* C405 wurde bei beiden Temperaturen bereits beschrieben (Kap. 3.5; Abb. 3.17). Dabei zeigte sich ein abgeschwächter Effekt der Temperatursensitivität. In Abb. 3.33 ist dieser Effekt jedoch nicht deutlich zu sehen; C405 zeigt bei einer Cefotaximkonzentration von 0,22 µg/ml bei 30 °C ein deutlich stärkeres Wachstum als bei 37 °C. Insgesamt sind

die ermittelten MHK-Werte etwas höher, als unter Kap. 3.5 beschrieben. Möglicherweise liegt dies an der hier durchgeführten feineren Abstufung der Antibiotikakonzentration in 0,02er Schritte.

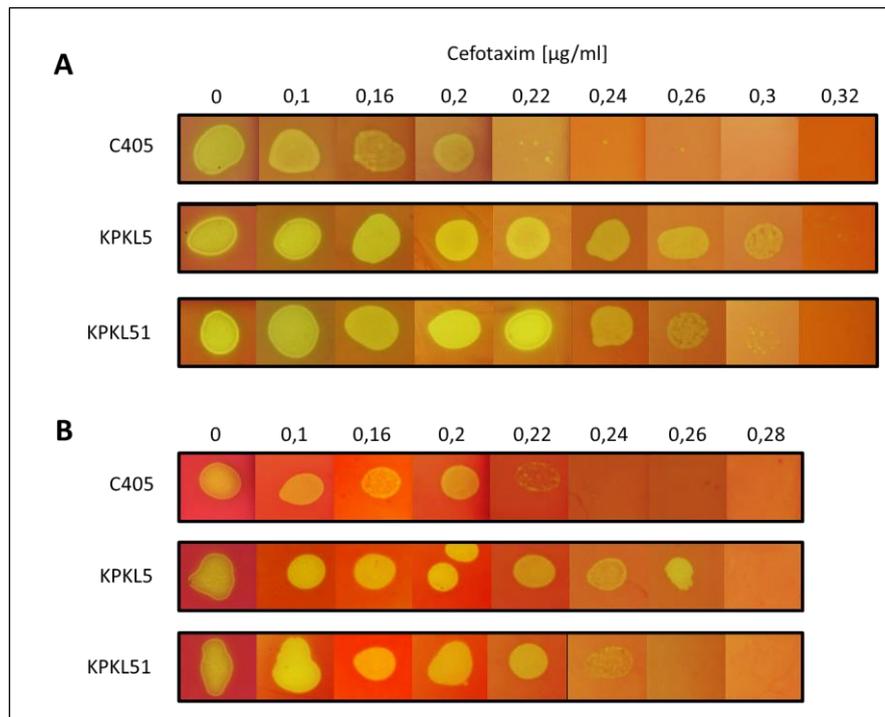


Abb. 3.33: Resistenz von *S. pneumoniae* C405, KPKL5 und KPKL51 gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C (A) und bei 30 °C (B). Die Abbildungen zeigen die MHK-Werte der Stämme C405, KPKL5 (C405 $\Delta htrA$) und KPKL51 (C405 $\Delta htrA htrA_{S234A}$), die mit Hilfe der Agardilutionsmethode ermittelt wurden. Die Cefotaximkonzentration ist in $\mu\text{g/ml}$ angegeben und von links nach rechts ansteigend dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentration erfolgte in 0,02er [$\mu\text{g/ml}$] Schritten. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen in C-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 30 inkubiert. Das Wachstum zeigt sich auf den D-Blutagarplatten durch die vergürnende α -Hämolyse der Bakterien.

Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL5 weist bei beiden Temperaturen eine im Vergleich zu C405 deutlich erhöhte Cefotaxim-Resistenz auf, wobei der Effekt der Resistenzhöhung bei 37 °C stärker ausgeprägt ist. Die ermittelte Resistenz des *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms KPKL51 gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim, liegt bei beiden untersuchten Temperaturen leicht unterhalb der des *htrA*-Deletionsstammes KPKL5. Dieser Stamm zeigt jedoch bei 30 °C, als auch bei 37 °C ebenfalls eine im Vergleich zu C405 deutlich gesteigerte Cefotaxim-Resistenz. Der Effekt der Resistenzhöhung im Stamm KPKL51 ist wie bei KPKL5 bei 37 °C ausgeprägter, als bei 30 °C. KPKL51 besitzt lediglich die Chaperonfunktion der Serinprotease HtrA und diese scheint sich den Ergebnissen zu Folge ebenfalls auf die Cefotaxim-Resistenz auszuwirken. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Tatsache der im Vergleich zu C405 erhöhten Proteinmengen des veränderten PBP2x in dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL5 und in dem *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms KPKL51 (Kap. 3.1.1.1). Folglich bestätigt dies die Theorie nach der eine erhöhte Menge an mutiertem PBP2x-Protein zur Steigerung der Resistenz führt. Allerdings müssen bei der Labormutante C405 das vorhandene *ciaH305*-Allel und möglicherweise weitere unbekannte Veränderungen mit berücksichtigt werden, die ebenfalls an diesem resistenzsteigernden Effekt beteiligt sein könnten.

Um den Einfluss der Serinprotease HtrA auf die Cefotaxim-Resistenz in den definierten genetischen Hintergründen mit jeweils verändertem PBP2x aus C405 bzw. C606 zu analysieren, wurden die MHKs von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 und ihrer *htrA*-Deletionsstämme KPKL3 bzw. KPKL4 bei beiden Temperaturen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.34 bzw. Abb. 3.35 dargestellt.

Für den Stamm R6_{pbp2xC405}-T6 wurde zuvor ein Effekt der Temperatursensitivität nachgewiesen (Kap. 3.5). Der Effekt ist auch aus Abb. 3.34 ersichtlich, da dieser Stamm bei 37 °C eine deutlich geringere Resistenz aufweist, als bei 30 °C. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL3 zeigt hingegen bei beiden Temperaturen eine identische MHK von 0,16 µg/ml Cefotaxim. Demnach wirkt sich das Fehlen der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund von R6 mit den AS-Austauschen L403F und T526S in PBP2x bei 37 °C anders aus als bei 30 °C; da der Stamm KPKL3 keine Temperatursensitivität zeigt. Bei einer Inkubation bei 37 °C wirkt sich das Fehlen der Serinprotease HtrA resistenzsteigernd aus; wohingegen die Inkubation von KPKL3 bei 30 °C die Cefotaxim-Resistenz im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T6 sinken lässt.

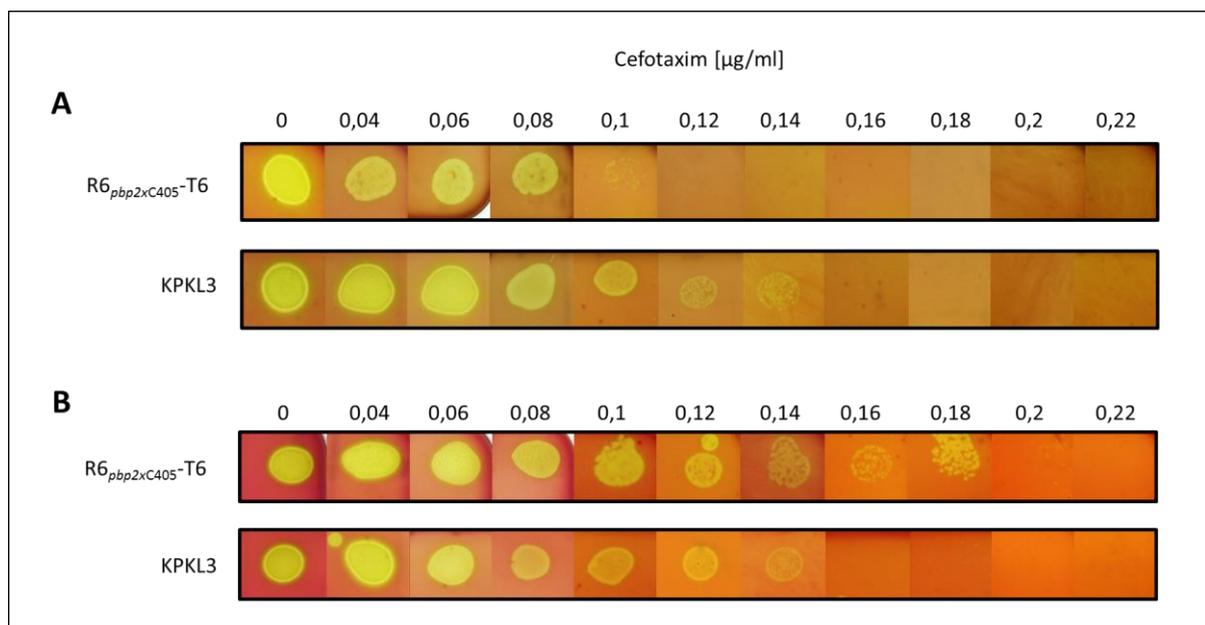


Abb. 3.34: Resistenz von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 und KPKL3 gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C (A) und bei 30 °C (B). Die Abbildungen zeigen die MHK-Werte der Stämme R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403F, T526S) und KPKL3 (R6, PBP2x L403F, T526S $\Delta htrA$), die mit Hilfe der Agardilutionsmethode ermittelt wurden. Die Cefotaximkonzentration ist in µg/ml angegeben und von links nach rechts ansteigend dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentration erfolgte in 0,02er [µg/ml] Schritten. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen in C-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 30 inkubiert. Das Wachstum zeigt sich auf den D-Blutagarplatten durch die vergürnende α -Hämolyse der Bakterien.

Für den Stamm R6_{pbp2xC606}-T6 wurde zuvor ein Effekt der Temperatursensitivität nachgewiesen (Koch, 2006; Zerfaß, 2010, diese Arbeit Kap. 3.5). Anhand der Abb. 3.35 ist dies deutlich zu erkennen, denn bei 37 °C erzielt dieser Stamm eine wesentlich geringere Cefotaxim-Resistenz als bei 30 °C. Des Weiteren zeigt dieser Stamm bei 37 °C eine Heteroresistenz, da das Wachstum bei 0,22, 0,24 und 0,26 µg/ml Cefotaxim zwar deutlich gehemmt wird, allerdings ein geringer Teil dieser Bakterien eine resis-

tente Subpopulation bilden. Dieses Phänomen wurde auch bei 30 °C beobachtet. Die Heteroresistenz gegenüber Penicillin wurde bereits in multiresistenten Klonen von *S. pneumoniae* nachgewiesen (Morand und Mühlemann, 2007). Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL4 zeigt bei 37 °C im Vergleich zu R6_{pbp2xC606}-T6 eine deutlich erhöhte Cefotaxim-Resistenz. Auch hier wurde der Effekt der Heteroresistenz beobachtet. Aufgrund der Deletion von HtrA wird das veränderte PBP2x mit den AS-Austauschen M289T, G422D, G597D und G601V in dem Stamm KPKL4 nicht abgebaut und liegt im Vergleich zu R6_{pbp2xC606}-T6 in erhöhter Menge vor.

Wie bereits für das veränderte PBP2x aus C405 gezeigt, führt auch hier die erhöhte Menge des mutierten PBP2x bei 37 °C zu einer Steigerung der Cefotaxim-Resistenz. Auch bei 30 °C zeigt sich bei KPKL4 im Vergleich zu R6_{pbp2xC606}-T6 ein Resistenzanstieg. Demnach wirkt sich das Fehlen der Serinprotease HtrA in diesem genetischen Hintergrund bei beiden Temperaturen resistenzsteigernd aus.

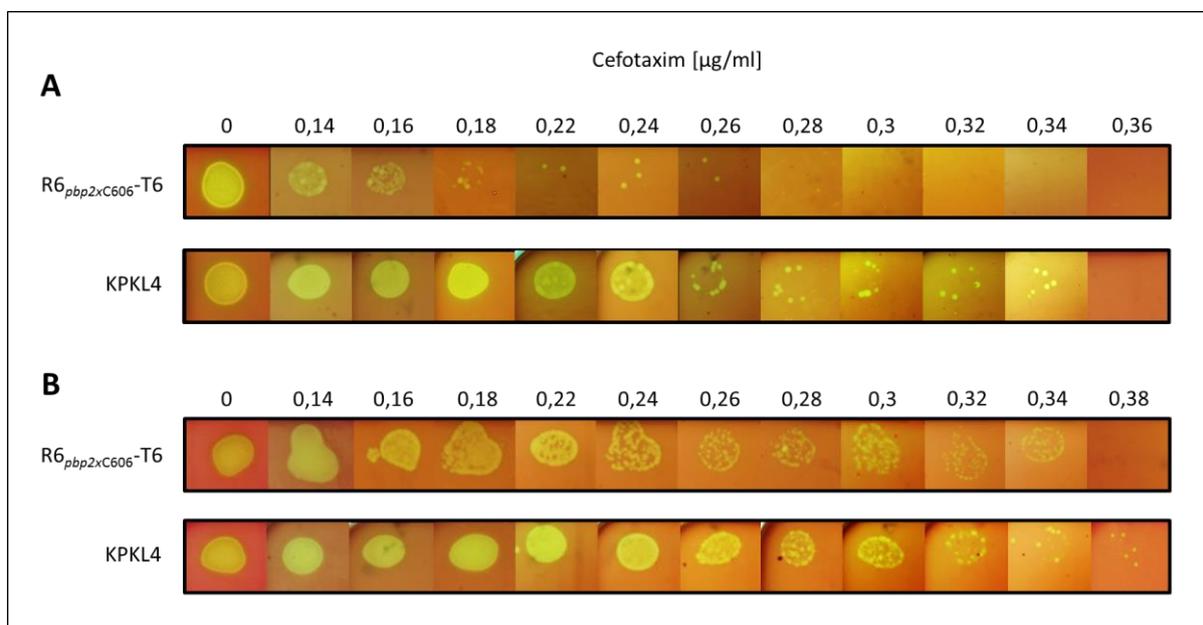


Abb. 3.35: Resistenz von *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC606}-T6 und KPKL4 gegen das β -Laktamantibiotika Cefotaxim bei 37 °C (A) und bei 30 °C (B). Die Abbildungen zeigen die MHK-Werte der Stämme R6_{pbp2xC606}-T6 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V) und KPKL4 (R6, PBP2x M289T, G422D, G597D, G601V Δ *htrA*), die mit Hilfe der Agardilutionsmethode ermittelt wurden. Die Cefotaximkonzentration ist in $\mu\text{g/ml}$ angegeben und von links nach rechts ansteigend dargestellt. Die Abstufung der Antibiotikakonzentration erfolgte in 0,02er [$\mu\text{g/ml}$] Schritten. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen in C-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer Zelldichte von N 30 inkubiert. Das Wachstum zeigt sich auf den D-Blutagarplatten durch die vergürnende α -Hämolyse der Bakterien.

Das veränderte PBP2x aus C606 besitzt im Vergleich zu dem veränderten PBP2x aus C405 zwei AS-Austausche mehr und wird bei 37 °C auch stärker durch die Serinprotease HtrA abgebaut (Kap. 3.3). Möglicherweise wird das mutierte PBP2x aus C606 daher auch bei 30 °C deutlich stärker abgebaut als das PBP2x aus C405, was wiederum die resistenzsteigernde Wirkung der Deletion von *htrA* im Stamm KPKL4 erklären würde.

3.8 Untersuchung der Lokalisation des GFP-PBP2_xC405-Fusionsproteins

Der Laborstamm *S. pneumoniae* C405 besitzt im Vergleich zu dem Wildtypstamm R6 eine ca. 6,3-mal geringere Menge des PBP2_x (Kap. 3.1.2). Für den Stamm *S. pneumoniae* R6_{pbp2xC405}-T6 wurde auch eine geringere PBP2_x-Menge nachgewiesen, die allerdings im Vergleich zu C405 erhöht ist (Kap. 3.3, Abb. 3.15). Da PBP2_x, das in *S. pneumoniae* essentiell ist (Kell *et al.*, 1993) und in beiden Stämmen sowohl in niederaffiner Form, als auch in geringer Menge vorliegt, ist davon auszugehen, dass sich die vorhandenen PBP2_x-Proteine ausschließlich an den Stellen in den Zellen lokalisieren, an denen sie dringend benötigt werden.

Um eine mögliche Auswirkung der verringerten PBP2_x-Menge auf die Lokalisation dieses Proteins zu untersuchen, wurde PBP2_x aus C405, das die zwei AS-Austausche T526S und L403F beinhaltet, an GFP fusioniert (Kap. 2.7.3.6; Abb. 2.9). Durch die Transformation des Plasmids pFP12 (Abb. 2.9) in C405 und R6_{pbp2xC405}-T6 entstanden die Stämme KPKL7 und KPKL8, die neben dem nativen *pbp2x* aus C405 noch eine weitere ektopische Kopie, das zinkinduzierbare *gfp-pbp2xC405*, besitzen.

Vorhergehende Studien wurden mit dem Stamm *S. pneumoniae* DKL03 durchgeführt, der nach der Induktion mit ZnCl₂ das Fusionsprotein GFP-PBP2_x mit dem PBP2_x aus dem Wildtypstamm R6 enthält. Das GFP-PBP2_x-Fusionskonstrukt besitzt eine funktionelle Transpeptidase-Domäne, da es in der Lage ist Bocillin, das fluoreszierende Penicillin V-Derivat, zu binden (Stahlmann, 2011). Fluoreszenzmikroskopischen Studien zeigten weiterhin eine Lokalisation des GFP-PBP2_x am Zellseptum (Stahlmann, 2011). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde nachgewiesen, dass das native *pbp2x* in dem Stamm DKL03, der die ektopische *gfp-pbp2x* Kopie beinhaltet, durch das Einbringen einer Spectinomycin-Resistenzkassette (Kap. 2.7.3.7, Abb. 2.10) deletiert werden kann (Stahlmann, 2011). In dem konstruierten *pbp2x*-Deletionsstamm DKL031 wurde weder die Morphologie, noch das Wachstum der Zellen dadurch negativ verändert, was wiederum die Funktionalität der GFP-PBP2_x-Fusion bestätigt (DKL031: bekannt als TX1, Stahlmann, 2011).

Das native *pbp2x* aus C405 wurde in den merodiploiden Stämmen KPKL8 und KPKL7 durch die Transformation des Plasmid p2xKO (Stahlmann, 2010) ebenfalls deletiert, wobei die Stämme KPKL81 und KPKL71 erstellt wurden.

Die merodiploiden Stämme KPKL7 und KPKL8 und die Stämme, KPKL71 und KPKL81, die lediglich die zinkinduzierbare Kopie *gfp-pbp2xC405* besitzen, wurden im Folgenden mittels Western-Blotanalysen untersucht und die Lokalisation der GFP-PBP2_xC405-Fusionskonstrukte mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

3.8.1 Immunodetektion von PBP2x und GFP-PBP2x-Proteinen in den Fusionskonstrukten und den *pbp2x*-Deletionskonstrukten

Mittels Western-Blotanalysen (Kap. 2.9.4) mit dem polyklonalen Antikörper α -PBP2x-Antikörpern (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) wurde untersucht, ob die erstellten Stämme *S. pneumoniae* KPKL7 und KPKL8 in der Lage sind, das Fusionsprotein GFP-PBP2x_{C405} unter induzierten Bedingungen zu synthetisieren. Des Weiteren wurden sowohl die PBP2x-Proteine, als auch die unterschiedlichen GFP-PBP2x-Fusionsproteine in den Zelllysaten der Stämme auf Mengenunterschiede hin analysiert. Zur Kontrolle der zinkinduzierbaren Synthese wurden Zelllysate aufgetragen, deren Zellen zuvor im C-Medium mit und ohne Zugabe von ZnCl₂ gewachsen waren (Kap. 2.9.1.2). Als Referenzstamm diente dabei *S. pneumoniae* R6. Die Stämme *S. pneumoniae* C405 und R6_{*pbp2x*C405}-T6, die nachweislich eine geringere Menge an PBP2x besitzen, wurden ebenfalls als Kontrollen mitgeführt.

In Abb. 3.36 sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse mit α -PBP2x Antikörpern zur Detektion von PBP2x und GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zelllysaten der untersuchten GFP-Stämme dargestellt. Bis auf KPKL71 und KPKL81, kann in allen Stämmen eine Proteinbande detektiert werden, die zwischen den 70 kDa- und 100 kDa-Banden des aufgetragenen Markers liegt und somit dem Molekulargewicht von PBP2x (82,3 kDa) entspricht. In den Stämmen KPKL81 und KPKL71 kann kein PBP2x detektiert werden, was die erfolgreiche Deletion des nativen *pbp2x* bestätigt.

Die Stämme C405 und KPKL7 weisen, sowohl beim Wachstum mit, als auch ohne Zinkchlorid, eine im Vergleich zu R6 deutlich geringere PBP2x-Menge auf. Bei den Stämmen R6_{*pbp2x*C405}-T6 und KPKL8 wird dagegen eine PBP2x-Menge detektiert, die mit der in R6 vergleichbar ist. Zuvor konnte allerdings gezeigt werden, dass der PBP2x-Mengenunterschied zwischen R6 und R6_{*pbp2x*C405}-T6 gering und daher schwer nachzuweisen ist (Kap. 3.3).

In den Zelllysaten der Stämme KPKL8 und KPKL81 wird nach Zugabe von Zinkchlorid eine Bande bei ca. 110 kDa nachgewiesen. Diese entspricht der Größe des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins, das demnach sowohl in KPKL8 als auch KPKL81 synthetisiert wird. Nach Zinkchlorid Zugabe wird in den Stämme KPKL7 und KPKL71 bei ca. 110 kDa eine Proteinbande detektiert, die der Größe des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins entspricht. Dies beweist, dass auch in diesen beiden Stämmen die Synthese erfolgt. Allerdings sind die Mengen des nachgewiesenen GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins in den Stämmen KPKL7 und vor allem KPKL71 deutlich geringer als in KPKL8 und KPKL81.

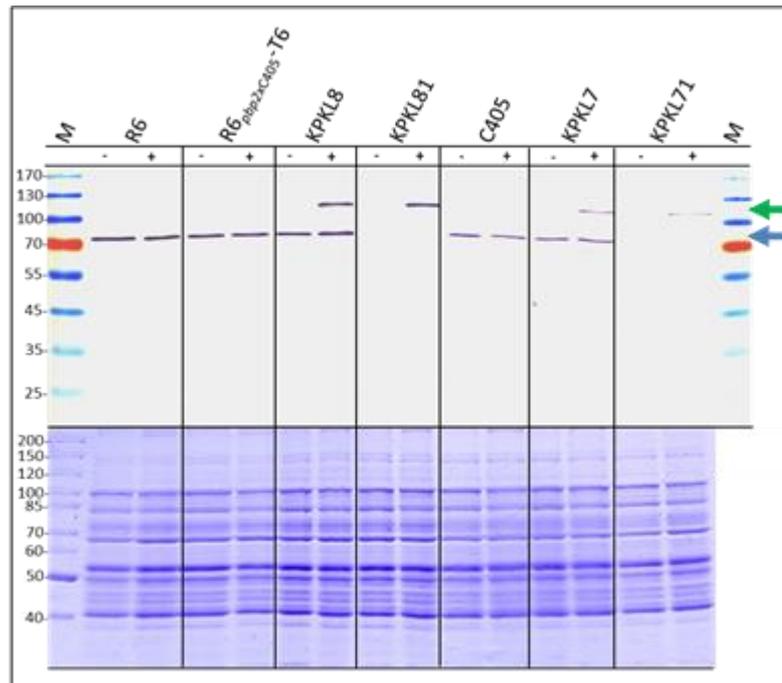


Abb. 3.36: Western-Blotanalyse mit α -PBP2x-Antikörpern zur Detektion von PBP2x und GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteinen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegefärbung der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403, T526S), KPKL8 (R6, PBP2x L403F, T526S, P_{czcD}-gfp-pbp2xC405), KPKL81 (KPKL8 Δ pbp2x), KPKL7 (C405, P_{czcD}-gfp-pbp2xC405), KPKL71 (KPKL7 Δ pbp2x). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 10 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Ein weiteres 10 %iges SDS-Gel wurde ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten PBP2x- (ca. 82 kDa, blauer Pfeil) und GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa, grüner Pfeil) sind markiert.

Die geringe PBP2x-Menge in dem Laborstamm C405 konnte bereits in direkte Verbindung mit dem *ciaH305*-Allel gebracht werden (Kap. 3.3), welches für eine erhöhte HtrA-Menge in dem Stamm verantwortlich ist. Aufgrund der erhöhten Menge der Serinprotease HtrA kommt es zu einem Abbau der PBP2x aus C405. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch die Fusionsproteine GFP-PBP2x_{C405} in KPKL7 und vor allem in KPKL71 offenbar abgebaut werden. In dem Zellysate des Stammes KPKL7, in dem nach Zinkzugabe sowohl PBP2x aus C405, als auch das GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsprotein in geringerer Menge vorliegen, zeigt sich für GFP-PBP2x_{C405} eine wesentlich geringere Menge als für das PBP2x aus C405. Dies lässt vermuten, dass sobald beide Proteine in der Zelle vorliegen, bevorzugt das GFP-PBP2x_{C405} abgebaut wird.

Die erzielten Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Western-Blotexperiment mit neu hergestellten Zellysaten bestätigt. In Abb. 3.37 sind die Resultate zu sehen. Alle zuvor beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der Proteinmengen an PBP2x und GFP-PBP2x_{C405} wurden verifiziert.

Die PVDF-Membran des bereits durchgeführten Western-Blots wurde erneut in Methanol aktiviert, mit α -PBP1a Antikörper (301, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Mouse-Antikörper behandelt. Da in allen Stämmen die gleiche PBP1a Proteinmenge erwartet wurde, sollte dieses Verfahren lediglich der Kontrolle der aufgetragenen Lysatmenge dienen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.37 in der Mitte dargestellt.

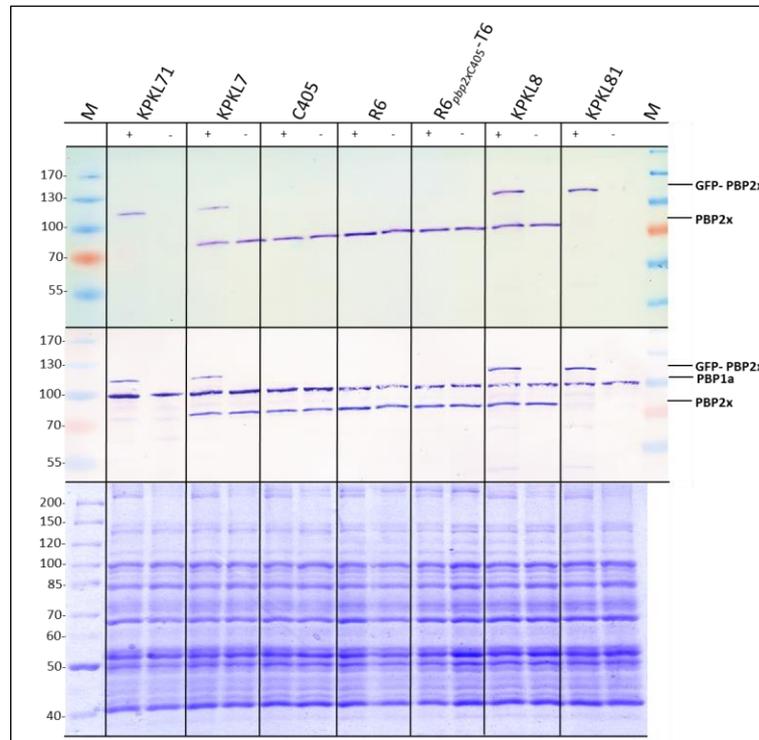


Abb. 3.37: Western-Blotanalyse mit α -PBP2x und α -PBP1a-Antikörpern der GFP-Stämme im genetischen Hintergrund von $R6_{pbp2xC405-T6}$ und C405. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegefärbung der Zellysate bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. $R6_{pbp2xC405-T6}$ ($R6$, PBP2x L403, T526S), KPKL8 ($R6$, PBP2x L403F, T526S, $P_{czcD-gfp-pbp2xC405}$), KPKL81 ($KPKL8 \Delta pbp2x$), KPKL7 ($C405$, $P_{czcD-gfp-pbp2xC405}$), KPKL71 ($KPKL7 \Delta pbp2x$). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM $ZnCl_2$ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 10 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Ein weiteres 10 %ige SDS-Gel wurde mit 5 μ l der gleichen Zellysate ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper (1646, Hakenbeck *et al.*, 1991) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab; oben). Die detektierten PBP2x- (ca. 80 kDa) und GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa) sind markiert. Die PVDF-Membran des bereits durchgeführten Western-Blots (oben) wurde erneut in Methanol aktiviert, mit dem primären monoklonalen Antikörper α -PBP1a (301; Hakenbeck *et al.*, 1991; 1:400) und anschließend mit dem sekundären α -Mouse-Antikörper (Sigma, 1:1.000) behandelt. M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten PBP1a Proteine (ca. 95 kDa) sind markiert (Mitte).

In allen Zellysaten der Stämme konnten, unabhängig von der Induktion mit Zinkchlorid, wie erwartet PBP1a Proteinbanden mit einer Größe von ca. 95 kDa detektiert werden. Erstaunlicherweise wurde für die Stämme C405 und dessen Derivate KPKL7 und KPKL71 eine ca. zweifach höhere PBP1a Menge nachgewiesen, als in allen anderen Stämmen, die den Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 als Ursprungstamm haben. Interessanterweise tritt die erhöhte Menge an PBP1a nur in Stämmen auf die eine deut

lich verringerte PBP2x-Menge besitzen. Das Coomassiegel der analysierten Stämme bestätigte dagegen identisch aufgetragene Zelllysate-Mengen. Diese Ergebnis konnte mit einem weiteren Experiment mit unabhängigen Zelllysaten der Stämme bestätigt werden und wurde weiter untersucht (Kap. 3.1.4). Um die die erstellten GFP-Stämme auf mögliche Abbauprodukte hin zu untersuchen, wurden Western-Blotanalysen mit dem polyklonalen α -GFP-Antikörper durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Kontrollstämme wie zuvor verwendet und verfahren wie bereits beschrieben (Kap. 2.9.4). Die Abb. 3.38 zeigt die erhaltenen Ergebnisse dieser Untersuchungen.

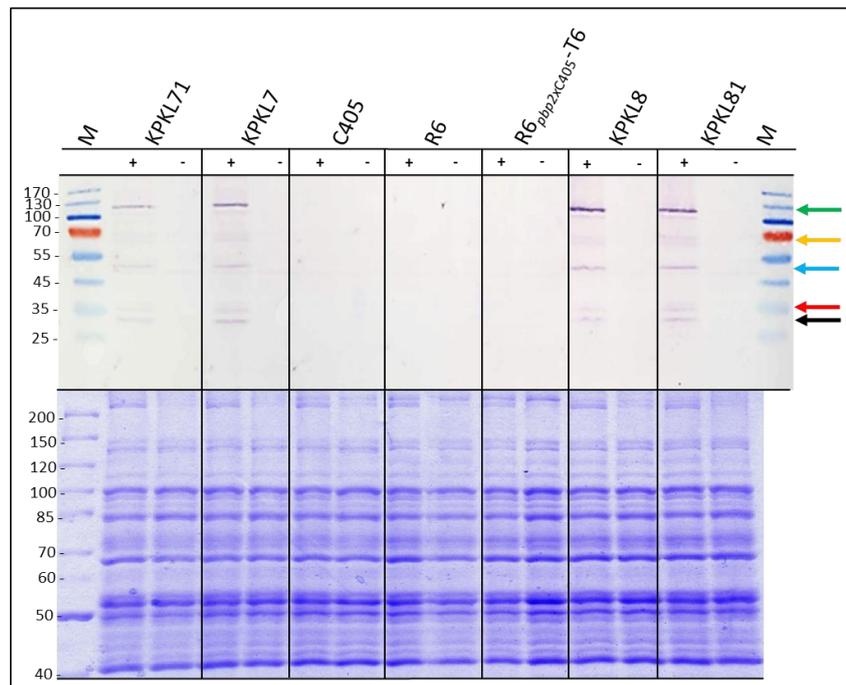


Abb. 3.38: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteinen in Zelllysaten der GFP-Stämme im genetischen Hintergrund von R6_{pbp2xC405}-T6 und C405. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegels der Zelllysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. R6_{pbp2xC405}-T6 (R6, PBP2x L403, T526S), KPCL8 (R6, PBP2x L403F, T526S, P_{czcD}-gfp-pbp2xC405), KPCL81 (KPCL8 Δ pbp2x), KPCL7 (C405, P_{czcD}-gfp-pbp2xC405), KPCL71 (KPCL7 Δ pbp2x). Auf ein 10 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 10 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Ein weiteres 12,5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μ l der gleichen Zelllysate ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen; 1:2.000; oben) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa, grüner Pfeil) sind markiert. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein gelber Pfeil (ca. 60 kDa), ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteine.

In den Zelllysaten der Stämme R6, C405 und R6_{pbp2xC405}-T6 konnte, wie erwartet keine Proteine detektiert werden konnte. Bei den Stämmen KPCL8, KPCL81, KPCL7 und KPCL71 wurde nach Induktion mit Zinkchlorid jeweils eine Proteinbande, mit einer Größe zwischen 100 und 130 kDa detektiert, die in der Größe dem Fusionsprotein GFP-PBP2x_{C405} (110 kDa) entspricht. Die Stämme KPCL8 und

KPKL81 wiesen dabei identische Proteinmengen des Fusionsproteins GFP-PBP2_xC₄₀₅ auf. In den Zelllysaten der Stämme KPKL7 und vor allen KPKL71 wurde dagegen eine wesentlich geringere Menge des Fusionsproteins nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse, die zuvor mit Hilfe der Western-Blotanalysen mit α -PBP2_x-Antikörpern erzielt wurden. Ferner wurden in den Stämmen KPKL7, KPKL71, KPKL8 und KPKL81 sehr ähnliche Profile an Abbauprodukten. In den Stämmen KPKL7 und vor allem KPKL71 zeigten sich nicht nur geringere Mengen an GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein, sondern auch geringere Mengen an Abbauprodukten.

In allen vier Stämmen konnten vier erkennbare Abbauprodukte detektiert werden. Dabei waren zwei Abbauprodukte in größeren Mengen vorhanden (Proteinbande zwischen 25-35 kDa: schwarzer Pfeil, Proteinbande zwischen 45-55 kDa: hellblauer Pfeil), als die anderen beiden (Proteinbande bei ca. 35 kDa: roter Pfeil; Proteinbande bei ca. 70 kDa: gelber Pfeil). Bei dem kleinsten detektierten Abbauprodukt handelt es sich offenbar um GFP (26 kDa). Die restlichen drei Abbauprodukte bestehen scheinbar aus GFP und einem jeweils unterschiedlich großen Teil an PBP2_xC₄₀₅.

3.8.2 Lokalisationsstudien der GFP-PBP2_x-Fusionskonstrukte und der *pbp2x*-Deletionskonstrukte

3.8.2.1 Führt die verringerte Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Proteins zu Unterschieden in der Lokalisation in den Stämmen *S. pneumoniae* KPKL8 und KPKL7?

Anhand der zuvor durchgeführten Western-Blotanalysen mit polyklonalen α -PBP2_x-Antikörpern wurde für den Stamm KPKL7 eine deutlich geringere GFP-PBP2_xC₄₀₅-Menge als im Stamm KPKL8 nachgewiesen. Demzufolge wirkt sich der genetische Hintergrund von C405 negativ auf die Menge des Fusionsproteins aus.

Um zu untersuchen, ob die verringerte Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Proteins zu Unterschieden in der Lokalisation in den Stämmen *S. pneumoniae* KPKL8 und vor allem KPKL7 führt, wurden Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Als Referenz diente der Stamm DKL03. Die Kulturen wurden dafür bei 30 °C inkubiert (Kap. 2.6.4.2), da beschrieben wurde, dass sich grün fluoreszierenden Proteine bei höheren Temperaturen schlechter falten können. Bei einer Zelldichte von N 70 und N 120 wurden sowohl fluoreszenzmikroskopische als auch phasenkontrastmikroskopische Bilder der Zellen angefertigt. Es wurde kein Unterschied in der Lokalisation festgestellt, der auf die jeweilige Wachstumsphase zurückzuführen wäre, vielmehr zeigte sich dass die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Zelldichte stieg. Daher sind im Folgenden ausschließlich die Bilder gezeigt, die bei einer Zelldichte von 120 N erstellt wurden. In Abb. 3.39 ist das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Referenzstamms DKL03 zu sehen.

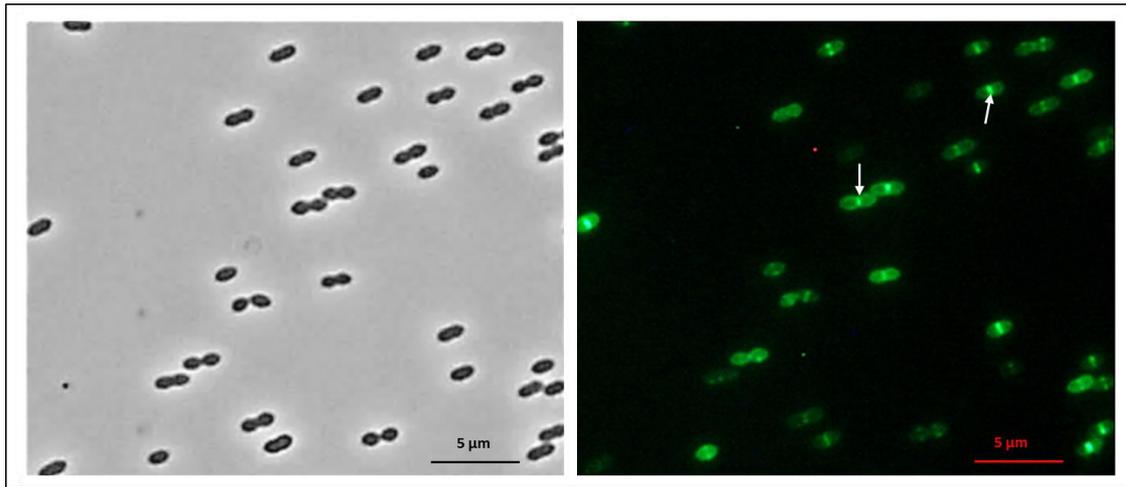


Abb. 3.39: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* DKL03. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von DKL03 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von $N\ 120$ angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Anhand der rechts gezeigten Phasenkontrastaufnahme ist deutlich zu erkennen, dass sich die Morphologie durch die Induktion mit $ZnCl_2$ nicht negativ verändert hat und mit der diplokokkalen Morphologie von *S. pneumoniae* R6 Zellen übereinstimmt. Links daneben ist eine Fluoreszenzaufnahme derselben Zellen zu sehen. Die Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins ist deutlich an den Zellsepten, an der Stelle an der sich die zwei Tochterzellen voneinander trennen, zu erkennen. Dies stimmt mit bereits vorhandenen Immunofluoreszenzerggebnissen zur Lokalisation von PBP2x (Morlot *et al.*, 2003) und vorhergehenden Lokalisationsstudien von GFP-PBP2x in lebenden *S. pneumoniae* Zellen (Stahman, 2011) überein.

Die Lokalisation des Stammes KPKL8, der ein GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsprotein mit den zwei AS-Austausche L403F und T526S in PBP2x beinhaltet und daneben ein natives PBP2x aus C405 besitzt, wurde analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 3.40 dargestellt. Anhand der Phasenkontrastaufnahme von KPKL8 ist keine deutliche morphologische Veränderung im Vergleich zu DKL03 zu erkennen. Das fluoreszenzmikroskopische Bild dieser Zellen offenbart dagegen überwiegend einheitlich grün leuchtende Zellen. Bei einigen Zellen, die in der Abb. 3.40 durch weiße Pfeile markiert sind, wurde dagegen eine Lokalisation an den Zellsepten beobachtet. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die mittels Western-Blotanalysen für KPKL8 ermittelt wurden. Das Fusionsprotein GFP-PBP2x_{C405} liegt zwar in der Zelle vor, ist möglicherweise aufgrund der AS-Austausche im PBP2x instabil sein und wird daher vermehrt abgebaut. Als Folge des Abbaus zeigt sich eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation der Fluoreszenz, da die Abbauproteine, die GFP beinhalten, leuchten. Möglicherweise wird das Lokalisationssignal von GFP-PBP2x_{C405} auch teilweise durch das Leuchten der kompletten Zelle überdeckt.

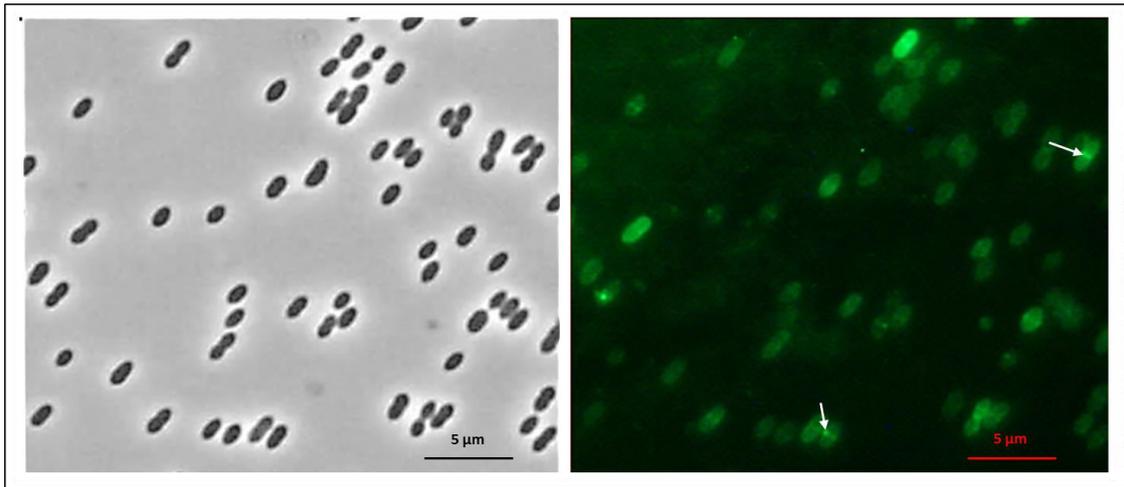


Abb. 3.40: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL8. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL8 (R6, PBP2x L403F, T526S, P_{czcD-gfp-pbp2x_{C405}}) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Im Anschluss wurde die Lokalisation von GFP-PBP2x_{C405} in dem Stamm KPKL7 untersucht. Ein charakteristisches Beispiel für die Lokalisation in dem Stamm KPKL7 ist in Abb. 3.41 zu finden.

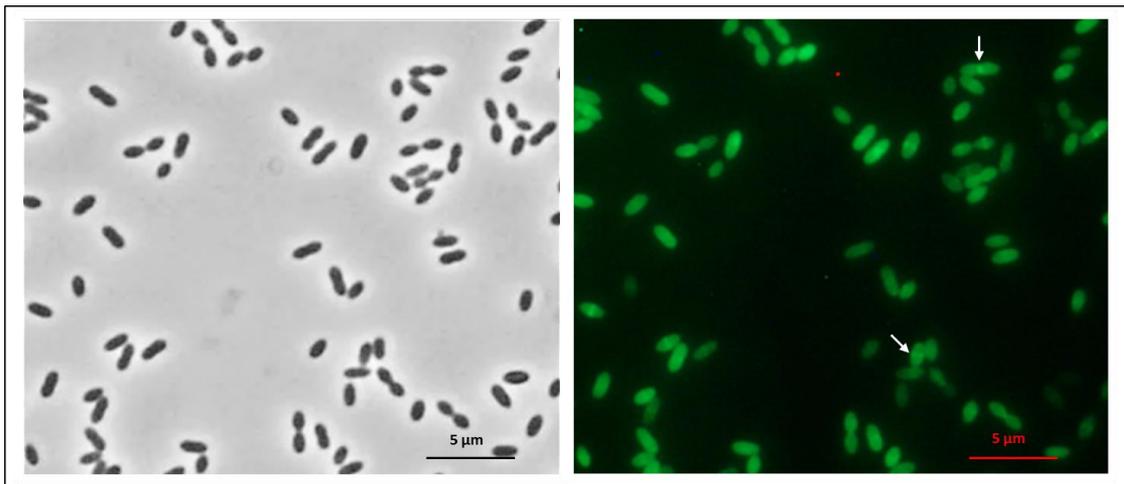


Abb. 3.41: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL7. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL7 (C405, P_{czcD-gfp-pbp2x_{C405}}) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Zellen des Stamms KPKL7 offenbaren im Vergleich zu DKL03 und KPKL8, Zellen die kleiner erscheinen. Die veränderte Zellgröße des Laborstamms C405 bei 30 °C wurde bereits unter Kap. 3.4 beschrieben. Da es sich bei KPKL7 um ein Derivat des Laborstamms C405 handelt, scheinen die gleichen Ursachen für die veränderte Zellmorphologie verantwortlich zu sein. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt einheitlich grün leuchtende Zellen, wobei die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu KPKL8 deutlich stärker ist. Nur in sehr seltenen Fällen lässt sich bei genauem Betrachten eine Lokalisation des GFP-PBP2x_{C405}-Proteins

am Zellseptum erkennen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten der Western-Blotanalyse. Anhand des Western-Blots mit α -GFP Antikörpern (Abb. 3.38) zeigten sich für den Stamm KPKL7 ebensolche Abbauprodukte wie in dem Stamm KPKL8. Zudem wurde in KPKL7 eine wesentlich geringere Menge des GFP-PBP2x_{C405} detektiert, als im Stamm KPKL8.

Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL8, KPKL7 und DKL03

Um die ermittelten Ergebnisse der Lokalisationsstudien der Stämme *S. pneumoniae* DKL03, KPKL8 und KPKL7 objektiv auswerten zu können, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. In der aufgestellten Statistik wurden ausschließlich fluoreszierende Zellen berücksichtigt. Bei der Einteilung der detektierten Signale der Zellen in Fluoreszenzprofile wurde verfahren wie unter Kap. 2.6.4.2 beschrieben. Der prozentuelle Anteil an Fluoreszenzprofilen, die unklar waren und daher keinem der definierten Profile zugeordnet werden konnten, wurde in den folgenden Abbildungen als roter Balken angegeben.

In der Abb. 3.42 ist der Vergleich der statistischen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL8, KPKL7 und DKL03 zu finden.

Für den Stamm DKL03 wurden hierfür insgesamt 364, für KPKL8 insgesamt 980 und für KPKL7 insgesamt 629 fluoreszierende Zellen ausgewertet. Die Stämme wiesen 7,3-26 % unklare Profile auf. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen bei dieser Methode nicht fixiert werden und sich daher während der fluoreszenzmikroskopischen Analyse nicht immer in einer Ebene befinden. Die Folge sind Profile, die nicht eindeutig eingeordnet werden können. Da der Anteil diese Profile jedoch bestimmt wurde und verhältnismäßig gering ist, kann dies vernachlässigt werden.

Das GFP-PBP2x-Fusionsprotein des Referenzstamms *S. pneumoniae* DKL03 lokalisiert sich zu 84,1 % wie erwartet. Davon sind 33,7 % kokkale Zellen, die ein Fluoreszenzsignal von GFP-PBP2x in Form von zwei leuchtenden Punkten aufweisen. Weitere 10,6 % sind ebenfalls ovale Zelle, die allerdings im Zellzyklus bereits weiter fortgeschritten sind, da sie in der Zellmitte bereits ein linienförmiges Signal von GFP-PBP2x erkennen lassen. Darüber hinaus waren 39,8 % der Zellen bereits noch weiter im Zellzyklus fortgeschritten und wiesen neben einer deutlichen Einschnürung der sich teilenden Zellen eine Lokalisation des GFP-PBP2x im Zellseptum auf. Lediglich 1,3 % der untersuchten Zellen waren oval und zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals. Diese Daten bestätigen, die bereits vorhandenen Daten hinsichtlich der Lokalisation von PBP2x (Morlot *et al.*, 2003; Stahlmann, 2011) und beweisen, dass das GFP-PBP2x funktionell ist.

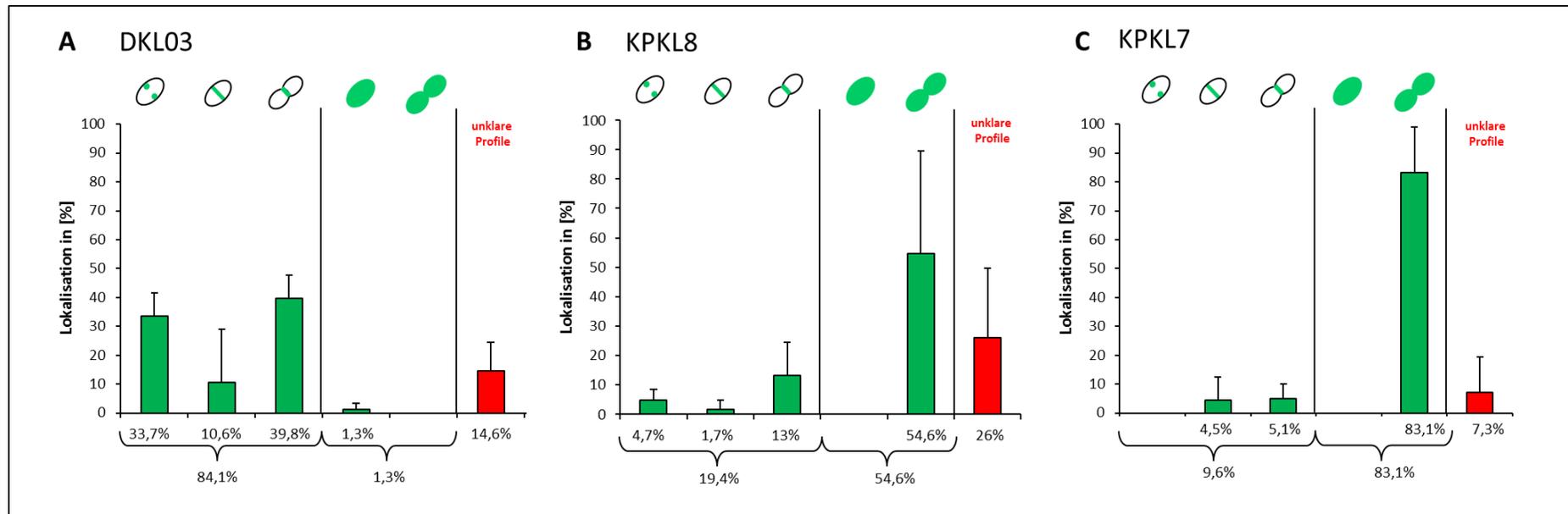


Abb. 3.42: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL03, KPKL8 und KPKL7. Dargestellt sind die statistischen Auswertungen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL03 (R6, $P_{czcD-gfp-pbp2x}$) (A), KPKL8 (R6, PBP2x L403F, T526S, $P_{czcD-gfp-pbp2x_{C405}}$) (B) und KPKL7 (C405, $P_{czcD-gfp-pbp2x_{C405}}$) (C) im Vergleich. Für jede statistische Auswertung wurden jeweils drei mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen, die aus zwei unabhängigen Experimenten stammen, ausgezählt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Stämme zuvor in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Nicht fluoreszierende Zellen wurden in den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ermittelten Lokalisation des jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionsproteins sind als grüne Balken dargestellt und in [%] angegeben. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die Mittelwerte der unklaren Profile sind als rote Balken dargestellt und in [%] angegeben. Septale bzw. äquatoriale Lokalisation des Fusionsproteins: : kokkale Zelle; Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins erscheint an zwei Stellen. : kokkale Form; Fluoreszenzsignal zeigt sich als Linie in der Zellmitte. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle ist zu erkennen; Fluoreszenzsignal wird am Septum detektiert. Zytoplasmatisch leuchtende Zellen: : kokkale Form. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle am Septum

Die statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Stamms KPKL8 bestätigen, die bereits anhand der Abb. 3.40 getroffenen Vermutungen eindeutig. Das veränderte GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein in diesem Stamm lokalisiert sich nur in 19,4 % der analysierten Zellen septal bzw. äquatorial. Dagegen zeigen 54,6% der Zellen dieses Stamms eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals, das sich über die ganze Zelle erstreckt. Dies korreliert mit der zuvor gezeigten repräsentativen Fluoreszenzaufnahme von KPKL8 (Abb. 3.40) und dem in Abb. 3.38 mittels α -GFP Antikörpern bewiesenen Abbau.

Bei der statistischen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudien des Stamms KPKL7 zeigten nur geringe 9,6 % der untersuchten Zellen eine septale Lokalisation. Im Vergleich zu dem Stamm KPKL8 und vor allem zu dem Referenzstamm DKL03, ist dies ein sehr deutlicher Abfall. Während der Anteil Zellen mit richtig lokalisierten GFP-PBP2_xC₄₀₅ sank, stieg der Anteil an Zellen, die ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal aufwiesen auf 83,1 % an. Dies stimmt mit den zuvor gezeigten Daten (Abb. 3.38 und Abb. 3.41) überein.

Demnach ist es gelungen die bereits bekannte Situation mit PBP2_x aus C405 mit GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteinen nachzustellen. Das GFP-PBP2_xC₄₀₅-Protein wird aufgrund seiner Veränderungen sowohl in KPKL7 als auch in KPKL8 abgebaut. In dem Stamm KPKL7, der den genetischen Hintergrund von C405 und auch das *ciaH305*-Allel besitzt, kommt es zu einem noch stärkeren Abbau des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Proteins. Je nach betrachtetem, genetischem Hintergrund der untersuchten Stämme, wurde ein Anstieg an zytoplasmatisch grün leuchtenden Zellen nachgewiesen.

3.8.2.2 Wirkt sich die Deletion des nativen PBP2_x aus C405 auf die Lokalisation der GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteine aus?

Der Stamm DKL031 besitzt neben der ektopischen, zinkinduzierbaren *gfp-pbp2_x*-Kopie auch das native *pbp2_x*. Die Stämme KPKL7 und KPKL8 beinhalten neben der *gfp-pbp2_xC₄₀₅*-Kopie das native *pbp2_x* aus C405. Die Zellen wurden für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen mit ZnCl₂ induziert und besaßen demnach bei den zuvor durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Experimenten, sowohl das jeweilige PBP2_x-Protein, als auch das GFP-PBP2_x- bzw. GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein.

Durch die Deletion des nativen *pbp2_x* aus C405 im Genom dieser Stämme wurde eine mögliche Konkurrenz zwischen dem PBP2_x aus C405 und dem GFP-PBP2_xC₄₀₅ verhindert. Durch diese Maßnahme wurde eine Steigerung der Fluoreszenzintensität erwartet. Des Weiteren können die ermittelten Fluoreszenzsignale, die in diesen *pbp2_x*-Deletionsstämmen KPKL81 und KPKL71 detektiert werden, direkt mit dem GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein in Verbindung gebracht werden. Die Auswirkung der Deletion des nativen PBP2_x aus C405 auf die Lokalisation der GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionskonstrukte wurde in den Stämmen KPKL71 und KPKL81 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und anschließend eine statistische Auswertung durchgeführt.

Der Stamm *S. pneumoniae* DKL031 diente bei diesen Untersuchungen als Referenz. Die Abb. 3.43 zeigt eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. pneumoniae* DKL031. Anhand der Phasenkontrastaufnahme wird bewiesen, dass die Deletion des *pbp2x* Gens unter induzierten Bedingungen sich nicht negativ auf die Morphologie auswirkt. Die Zellen besitzen bei einer Induktion mit 0,15 mM ZnCl_2 eine identische diplokokkale Morphologie wie der Parentalstamm DKL03 (Abb. 3.39). Die Fluoreszenzaufnahme derselben Zellen offenbart die Lokalisation der GFP-PBP2x-

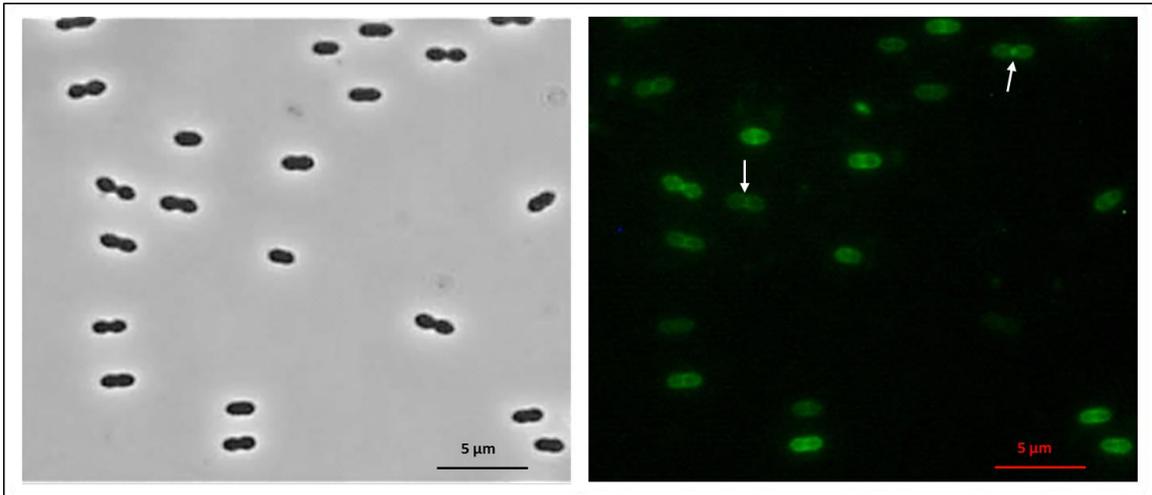


Abb. 3.43: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* DKL031. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von DKL031 ($R6, P_{czd}-gfp-pbp2x \Delta pbp2x$) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl_2 (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von $N 120$ angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Fusionsproteine an den Zellsepten. Das Lokalisationsmuster unterscheidet sich dabei nicht von dem Stamm DKL03, der zusätzlich ein natives PBP2x besitzt. Dies stimmt mit vorhergehenden Experimenten überein (Stahlmann, 2011). In Abb. 3.44 sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Stamms KPKL81 dargestellt.

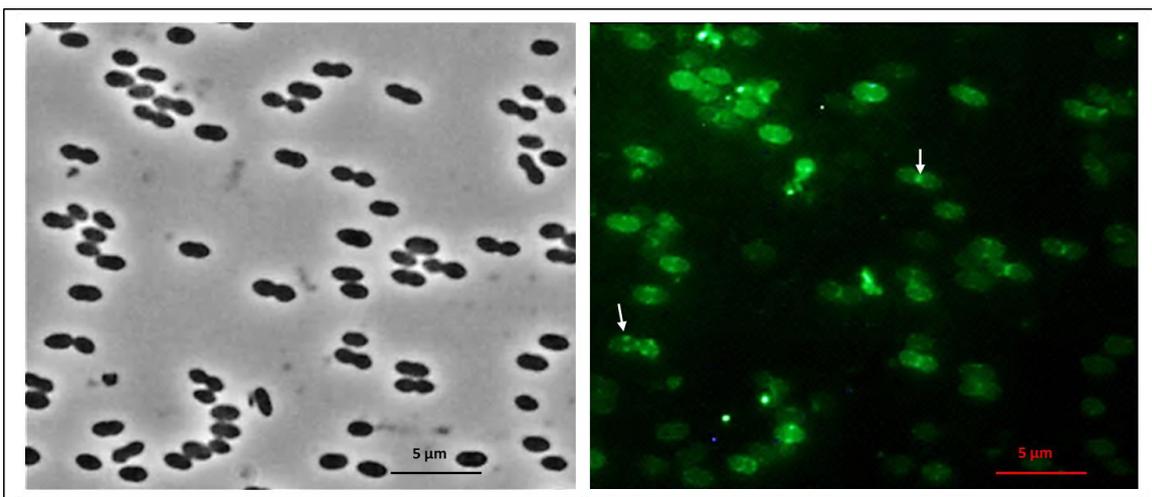


Abb. 3.44: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL81. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL81 ($P_{czd}-gfp-pbp2x_{C405} \Delta pbp2x$) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl_2 (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von $N 120$ angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Das Phasenkontrastbild zeigt keinerlei morphologische Unterschiede zu dem Parentalstamm KPKL8. Anhand der Fluoreszenzaufnahme zeigt sich eine ähnliche, jedoch besser zu erkennende Lokalisation des Fluoreszenzsignals, wie bereits für den Parentalstamm KPKL8 beschrieben (Abb. 3.40). Es zeigen sich überwiegend grün leuchtende Zellen; mehrere Zellen weisen jedoch eine deutlich erkennbare Lokalisation des GFP-PBP2_{x_{C405}} am Zellseptum auf. Dies stimmt mit den Western-Blotdaten überein, bei denen mittels α -GFP Antikörpern in dem Zelllysaten des Stammes KPKL81 identische Mengen an Abbauprodukten wie in dem Parentalstamm KPKL8 detektiert wurden (Abb. 3.38).

Die Abb. 3.45 offenbart ein charakteristisches Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Stammes KPKL71. Die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Zellen des Stammes KPKL71 zeigt eine ähnliche Zellmorphologie wie der Parentalstamm KPKL7, da die Zellen im Vergleich zu KPKL81 und DKL031 kleiner wirken. Die möglichen Ursachen liegen in dem genetischen Hintergrund dieses Stammes, der ein Derivat des Laborstammes C405 ist und wurden zuvor beschrieben (Kap. 3.4).

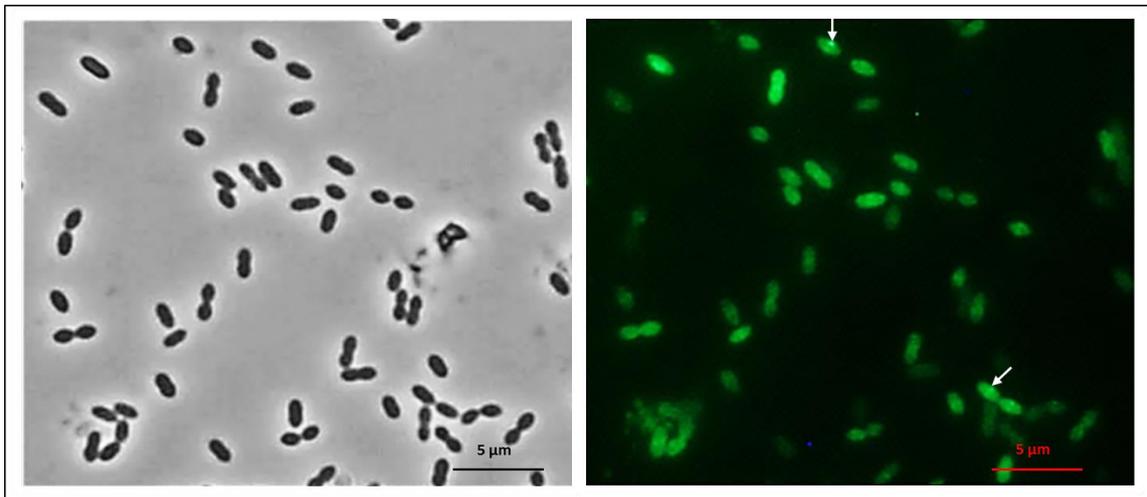


Abb. 3.45: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL71. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL71 (C405, $P_{cCD-gfp-pbp2x_{C405}} \Delta pbp2x$) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Anhand der Fluoreszenzaufnahme zeigen sich ebenso wie im Parentalstamm KPKL7, überwiegend Zellen, die komplett grün leuchten. Nur in einigen wenigen Zellen zeigt sich eine korrekte Lokalisation des GFP-PBP2_{x_{C405}}-Proteins an den Zellsepten. Das Ergebnis stimmt mit den Daten der Western-Blotanalyse mit α -GFP Antikörpern (Abb. 3.38) der Zelllysate des Stammes KPKL71 überein, da in KPKL71 eine sehr geringe Menge des GFP-PBP2_{x_{C405}} detektiert wurde; die sogar geringer war als in dem Parentalstamm KPKL7. Zudem wurden geringere Mengen an Abbauprodukten im Vergleich zu KPKL7 nachgewiesen.

Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL81, KPKL71 und DKL031

Die ermittelten Ergebnisse der Lokalisationsstudien der Stämme *S. pneumoniae* DKL031, KPKL81 und KPKL71 wurden in einer statistischen Analyse ausgewertet, verglichen und sind in Abb. 3.46 dargestellt. Dabei wurden die Zellen in identische Kategorien unterteilt, wie bereits zuvor beschrieben (Kap. 3.8.2.1). Für den Stamm DKL031 wurden insgesamt 387, für KPKL81 insgesamt 1161 und für KPKL71 insgesamt 899 fluoreszierende Zellen ausgewertet. Die Stämme wiesen 4,8-42,3% unklare Profile auf.

Laut der statistischen Analyse wiesen 84,1 % der untersuchten Zellen des Stamms DKL031 eine septale bzw. äquatoriale Lokalisation der GFP-PBP2x-Fusionsproteine auf. Dagegen zeigten 7,3 % der Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals. Damit stimmen die Daten nahezu komplett mit den statistischen Daten des Parentalstamms DKL03 überein (Abb. 3.42). Demnach wurde bestätigt, dass die Deletion des nativen PBP2x in diesem Stamm keinerlei Auswirkung auf die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-PBP2x in der Zelle hat.

Die statistische Analyse der Fluoreszenzsignale des Stamms KPKL81 offenbarte 43,1 % der Zellen mit einer septalen bzw. äquatorialen Lokalisation des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins. Dabei ist ein deutlicher Anstieg im Vergleich zum Parentalstamm KPKL8 zu sehen, der zusätzlich ein natives PBP2x aus C405 besitzt und 19,4% septale bzw. äquatorial lokalisierte Zellen auswies (Abb. 3.42). Jedoch ist zu beachten, dass der Anteil an unklaren Profilen in dem Stamm KPKL81 mit 43,1 % relativ hoch ist, was möglicherweise die Ergebnisse verfälscht. Nichts desto trotz scheint sich die Deletion des PBP2x aus C405 in diesem Stamm positiv auf die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-PBP2x_{C405} auszuwirken, da in dem Stamm KPKL81 auch nur 14,6 % Zellen ein zytoplasmatische Fluoreszenzsignal aufweisen. Möglicherweise konkurrieren die zwei Proteine PBP2x aus C405 und GFP-PBP2x_{C405} in dem Stamm KPKL81 miteinander, was sich negativ auf die Detektierbarkeit der Lokalisation des Fusionsproteins auswirkt.

Der Stamm KPKL71 weist 14,9 % Zellen auf, die eine septale bzw. äquatoriale Lokalisation des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins zeigen. Damit ist der Anteil im Vergleich zum Parentalstamm KPKL7 (9,6 %, Abb. 3.42) leicht erhöht. Mit 80,3 % der KPKL71 Zellen, die ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal demonstrieren, ist der Anteil nahezu so hoch wie in dem Parentalstamm KPKL7. Demnach lässt sich sagen, dass die Deletion des PBP2x aus C405 in dem Stamm zu keiner deutlichen Veränderung der Lokalisation des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins führte. Die geringe Menge des GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteins in dem Stamm KPKL71 lokalisiert sich, immer an den Zellsepten, wenn es nicht abgebaut wird. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das PBP2x ausschließlich dort am dringendsten benötigt wird.

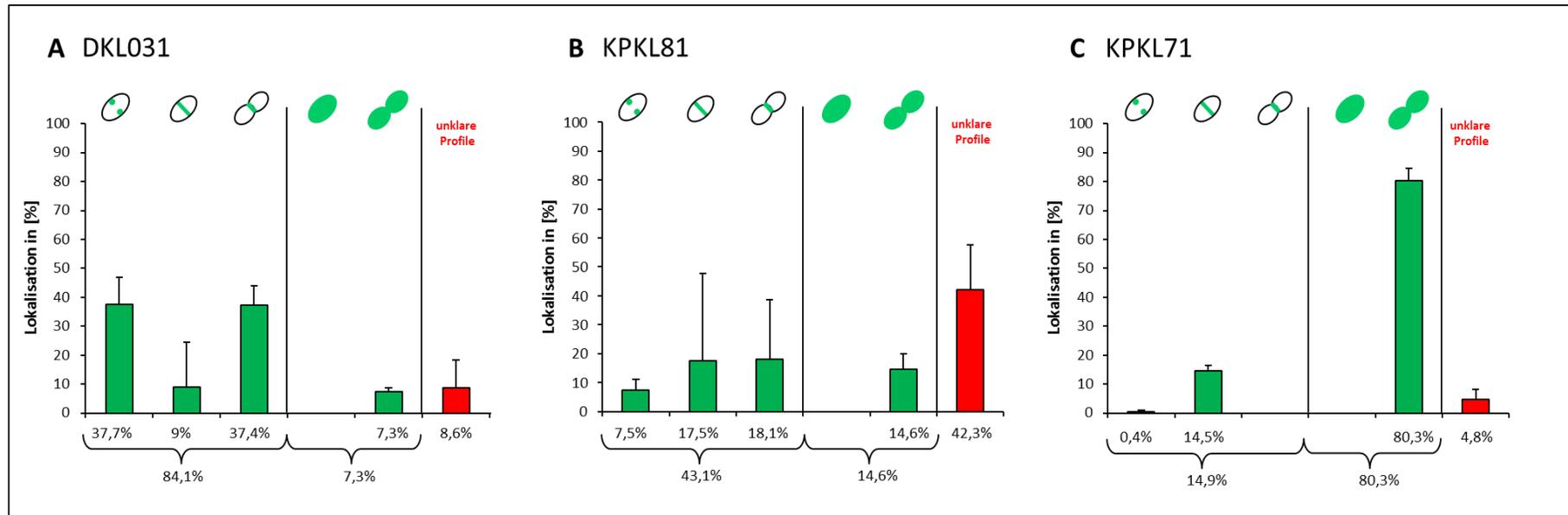


Abb. 3.46: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL031, KPKL81 und KPKL71. Dargestellt sind die statistischen Auswertungen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL031 (R6, $P_{czcD-gfp-pbp2x} \Delta pbp2x$) (A), KPKL81 ($P_{czcD-gfp-pbp2x} C_{405} \Delta pbp2x$) (B) und KPKL71 (C405, $P_{czcD-gfp-pbp2x} C_{405} \Delta pbp2x$) (C) im Vergleich. Für jede statistische Auswertung wurden jeweils drei mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen, die aus zwei unabhängigen Experimenten stammen, ausgezählt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Stämme zuvor in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Nicht fluoreszierende Zellen wurden in den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ermittelten Lokalisation des jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionsproteins sind als grüne Balken dargestellt und in [%] angegeben. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die Mittelwerte der unklaren Profile sind als rote Balken dargestellt und in [%] angegeben. Septale bzw. äquatoriale Lokalisation des Fusionsproteins: : kokkale Zelle; Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins erscheint an zwei Stellen. : kokkale Form; Fluoreszenzsignal zeigt sich als Linie in der Zellmitte. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle ist zu erkennen; Fluoreszenzsignal wird am Septum detektiert. Zytoplasmatisch leuchtende Zellen: : kokkale Form. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle am Septum

3.8.3 Die verringerte Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteins und die Rolle der Serinprotease HtrA

Für die Stämme KPKL7 und KPKL71 wurden anhand von Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern eine deutlich geringere Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅ und vier deutliche Abbauprodukte detektiert (Abb. 3.38). Mit der verringerten PBP2_x-Menge in dem Laborstamm C405 wurde neben den AS-Austauschen L403F und T526S in PBP2_x auch das *ciaH305*-Allel (Kap. 3.3) in Verbindung gebracht. Das *ciaH305*-Allel ist für die erhöhte Promotoraktivität von P_{htrA} und somit für die erhöhte Proteinmenge der Serinprotease HtrA in den Zellen mit dem genetischen Hintergrund von C405 verantwortlich. Die Serinprotease HtrA ist wiederum in der Lage das falsch gefaltene PBP2_x aus C405 abzubauen.

Um zu überprüfen, ob die Serinprotease HtrA, wie vermutet das Fusionsprotein GFP-PBP2_xC₄₀₅ in den Stämmen KPKL8, KPKL81 und vor allem KPKL7 und KPKL71 tatsächlich abbaut, wurde das Gen *htrA* in den Stämmen KPKL81 und KPKL71 mittels Kanamycin-Resistenzkassette deletiert (Kap. 2.7.3.1). Anschließend wurden Zelllysate der Stämme mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern auf Mengenunterschiede der GFP-PBP2_x-Fusionsproteine und der Abbauprodukte hin analysiert. Als Kontrollen dienten dabei Zelllysate der Stämme DKL03 und DKL031. Von jedem Stamm wurden sowohl Zelllysate von Kulturen analysiert, die zuvor mit, als auch ohne ZnCl₂ hochgezogen wurden.

In Abb. 3.47 sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen für die Stämme KPKL7, KPKL71, KPKL711 und die Kontrollstämme DKL03 und DKL031 zu sehen. Alle fünf untersuchten Stämme weisen nach Induktion mit ZnCl₂ eine Proteinbande auf, die zwischen 100 und 130 kDa lokalisiert ist und dem jeweilige GFP-PBP2_x-Fusionsprotein (ca. 110 kDa) entspricht. Interessanterweise können in den Zelllysaten aller fünf Stämme des Weiteren mehrere Abbauprodukte nachgewiesen werden.

In den Kontrollstämmen DKL03 und DKL031 wurde das Fusionsprotein GFP-PBP2_x in identischen Mengen nachgewiesen. Ferner zeigten diese Stämme, bis auf eine in DKL03 stärker ausgeprägte Proteinbande unterhalb des GFP-PBP2_x-Fusionsproteins (bei ca. 100 kDa), das gleiche Muster und die gleichen Mengen der Abbauprodukte. In den beiden Stämmen KPKL7 und KPKL71 wird die gleiche Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteins nachgewiesen, die allerdings im Vergleich zu den Kontrollstämmen verringert ist. Außerdem werden in den Stämmen KPKL7 und KPKL71 deutlich erhöhte Mengen an allen Abbauprodukten im Vergleich zu den Referenzstämmen detektiert. Dies erklärt wiederum die zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals, das in diesen Zellen nachgewiesen wurde. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 besitzt eine Proteinmenge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteins, die mit der detektierten Proteinmenge des GFP-PBP2_x in DKL03 und DKL031 übereinstimmt.

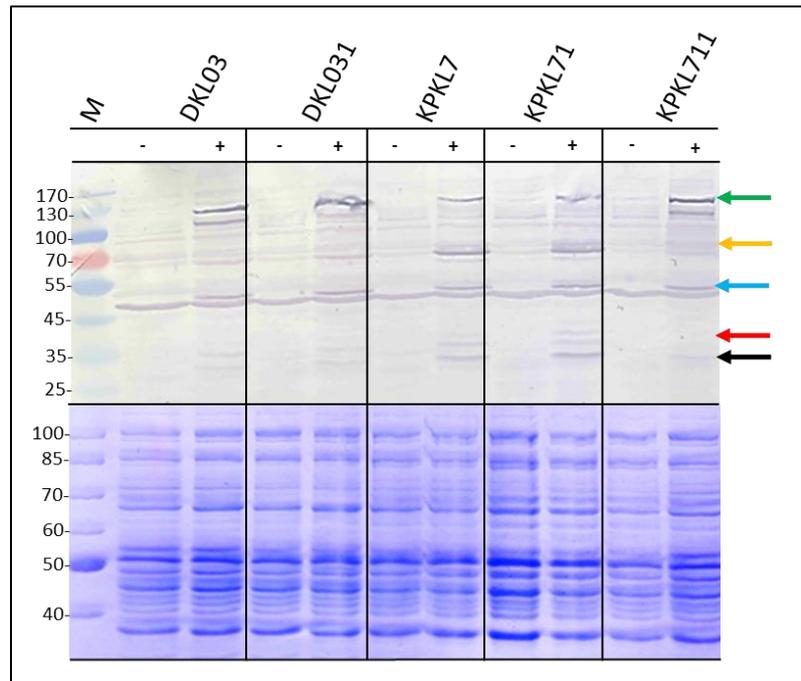


Abb. 3.47: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zelllysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL7, KPKL71 und KPKL711. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegels der Zelllysate bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL03 (R6, P_{ccdD} - gfp - $pbp2x$), DKL031 (DKL03 Δ $pbp2x$), KPKL7 (C405, P_{ccdD} - gfp - $pbp2x_{C405}$), KPKL71 (KPKL7 Δ $pbp2x$), KPKL711 (KPKL71 Δ $htrA$). Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM $ZnCl_2$ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Ein weiteres 12,5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μ l der gleichen Zelllysate ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen; 1:2.000; oben) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). Die detektierten GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa, grüner Pfeil) sind markiert. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein gelber Pfeil (ca. 60 kDa), ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine.

Zusätzlich fällt auf, dass zwei der Abbauproteine, die in allen anderen Stämmen nachgewiesen werden konnten, in dem $htrA$ -Deletionsstamm KPKL711 nicht vorhanden sind. Dabei handelt es sich um ein Abbauprotein mit der Größe von ca. 35 kDa (roter Pfeil) und ein zweites mit der Größe von ca. 60 kDa (gelber Pfeil). Weiterhin kann anhand der Abb. 3.47 wahrgenommen werden, dass die zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa, die nur in DKL031 und vor allem in DKL03 detektiert werden konnte, auch in dem Stamm KPKL711 auftritt. Mit Hilfe des Zelllysats des $htrA$ -Deletionsstamm KPKL711 wurde eindeutig bewiesen, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2x_{C405} in den Stämmen KPKL7 und KPKL71 ebenfalls von der Serinprotease abgebaut wird.

Um zu überprüfen, ob HtrA das Fusionsprotein GFP-PBP2x_{C405} außerhalb des genetischen Hintergrunds von C405 und daher unabhängig von dem aktivierten CiaRH-System abbaut, wurde Zellysate des *htrA*-Deletionsstamms KPKL811 und seinen Vorgängerstämmen KPKL8, KPKL81 und den Kontrollstämmen DKL03 und DKL031 untersucht. In Abb. 3.48 sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern dieser Stämme dargestellt.

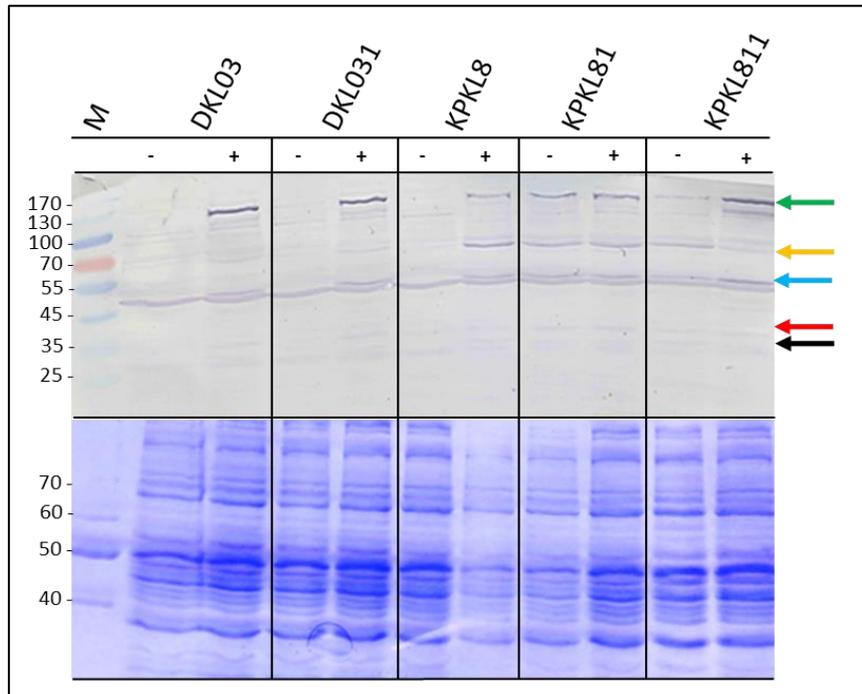


Abb. 3.48: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zellysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL8, KPKL81 und KPKL811. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegefärbten Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL03 (R6, P_{ciaD} -*gfp-pbp2x*), DKL031 (DKL03 Δ *pbp2x*), KPKL8 (R6, PBP2x L403F, T526S, P_{ciaD} -*gfp-pbp2x*_{C405}), KPKL81 (KPKL8 Δ *pbp2x*), KPKL811 (KPKL81 Δ *htrA*). Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Ein weiteres 12,5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μ l der gleichen Zellysate ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen) 1:2.000 (oben) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die detektierten GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa, grüner Pfeil) sind markiert. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein gelber Pfeil (ca. 60 kDa), ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine.

Bei der Durchführung des Western-Blots wurde versehentlich die Probe KPKL8 (+) zweimal aufgetragen. Demnach entspricht die Probe KPKL81 (-) ebenfalls der Probe KPKL8 (+) und die entsprechende Probe (-) fehlt. Die Zellysate der Kontrollstämmen DKL03 und DKL031 weisen die gleichen Abbauprofile auf, die bereits für Abb. 3.48 beschrieben wurden. Allerdings die Abbaubande bei 100 kDa bei DKL03 auf diesem Western-Blot nur recht undeutlich zu erkennen. Das Zellysate des Stamms KPKL81 weist im Vergleich zu DKL03 und DKL031 eine deutlich geringere Menge des Fusionspro-

teins auf. Des Weiteren wurde in diesem Stamm eine deutlich stärker ausgeprägte Abbaubande bei ca. 60 kDa (gelber Pfeil) detektiert, als in den Kontrollstämmen. Das Zelllysate des *htrA*-Deletionsstamm KPKL811 weist eine Proteinmenge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteins auf, die mit der detektierten Proteinmenge des GFP-PBP2_x in DKL03 durchaus vergleichbar ist. Das Abbauprodukt bei ca. 60 kDa (gelber Pfeil), das zuvor detektiert wurde, wird in dem Stamm KPKL811 nicht mehr nachgewiesen. Der Stamm KPKL811 weist zudem eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa auf. Beides wurde bereits für den *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 gezeigt und beschrieben (Abb. 3.47). Mit Hilfe des *htrA*-Deletionsstamm KPKL811 konnte bewiesen werden, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2_xC₄₀₅ in den Parentalstamm KPKL81 ebenfalls von der Serinprotease HtrA abgebaut wird.

Um zu untersuchen, ob sich diese erhöhten Mengen an GFP-PBP2_xC₄₀₅ in den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL711 und KPKL811 auf der Lokalisation auswirken, wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen dieser Stämme durchgeführt und die detektierten Fluoreszenzprofile statistisch ausgewertet.

In Abb. 3.49 ist eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme der *S. pneumoniae* KPKL811 Zellen zu sehen. Es zeigt sich die gleiche Lokalisation, die bereits für den Parentalstamm KPKL81 beschrieben wurde (Abb. 3.44). Aufgrund der im Vergleich zu KPKL81 erhöhten Menge des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsproteins wurden deutliche Fluoreszenzsignale an den Zellsepten und eine geringere zytoplasmatische Lokalisation erwartet. Allein anhand dieser Fluoreszenzaufnahme ist dies nicht zu beweisen.

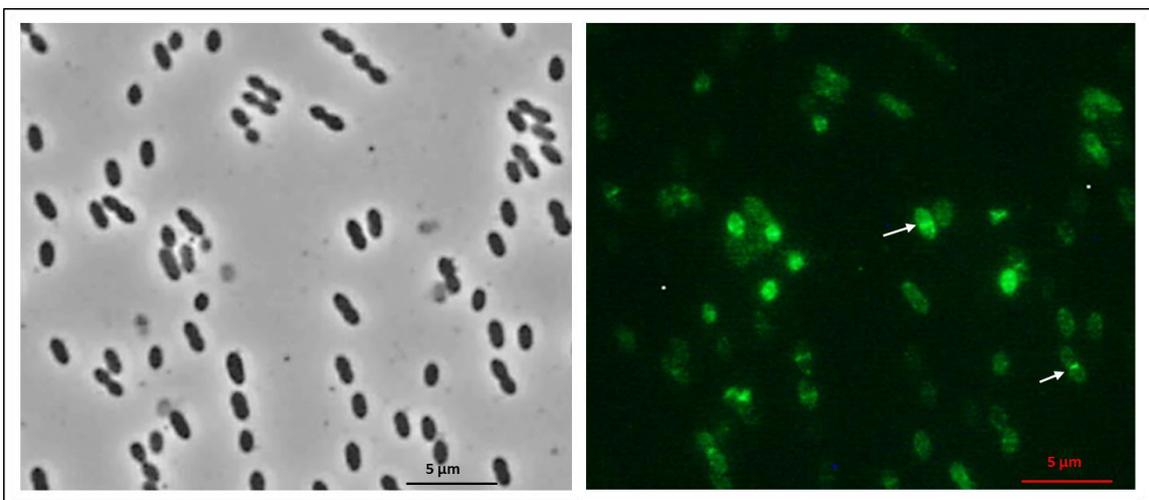


Abb. 3.49: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL811. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL811 (P_{czcD} -*gfp-pbp2_xC₄₀₅* Δ *pbp2_x* Δ *htrA*) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Die Abb. 3.50 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme des Stamms *S. pneumoniae* KPKL711. Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass die analysierten Zellen eine richtige Lokalisation der GFP-PBP2_{C405}-Proteine an den Zellsepten aufweisen.

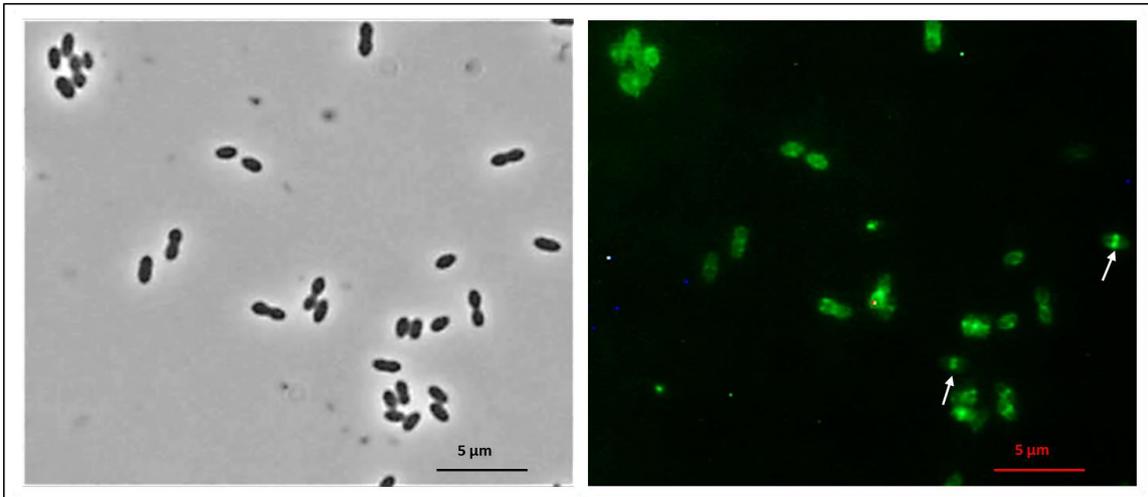


Abb. 3.50: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL711. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von KPKL711 (C405, P_{czcD} -*gfp-pbp2x_{C405}* Δ *pbp2x* Δ *htrA*) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Im direkten Vergleich zu der Fluoreszenzaufnahme des Parentalstamms KPKL71 (Abb. 3.45) sind die KPKL711 Zellen deutlich weniger grün. Da dieser Stamm keine Serinprotease HtrA besitzt, wird das Fusionsprotein GFP-PBP2_{C405} nicht durch diese abgebaut. Daher zeigt sich eine deutlich geringere zytoplasmatische Lokalisation des Fluoreszenzsignals, die wiederum das eigentliche Signal des GFP-PBP2_{C405} nicht mehr überdeckt.

In den Stämme DKL03 und DKL031, die in den vorangegangenen Versuchen als Kontrollstämme verwendet wurden, konnten mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern deutliche Abbauprodukte nachgewiesen werden (Abb. 3.47 und Abb. 3.48). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2_x, das im Gegensatz zu GFP-PBP2_{C405} keine AS-Austausche besitzt, die es möglicherweise destabilisieren und dadurch den Abbau durch HtrA begünstigen, bereits abgebaut wird. Daher lag es nahe zu untersuchen, in wie weit das Fusionsprotein GFP-PBP2_x ebenfalls durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird. In dem Stamm DKL031 wurde deshalb das Gen *htrA* mittels Kanamycin-Resistenzkassette (Kap. 2.7.3.1) ersetzt und auf diese Weise der *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 erstellt. Im Folgenden wurden Zellysate der *htrA*-Deletionsstämme KPKL09, KPKL711 und KPKL811 und ihrer jeweiligen Parentalstämme mit Hilfe von Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern und mit α -HtrA-Antikörpern untersucht. Als zusätzliche Kontrolle diente dabei ein Zellysate des Stamms DKL031. In der Abb. 3.51 sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse zu sehen.

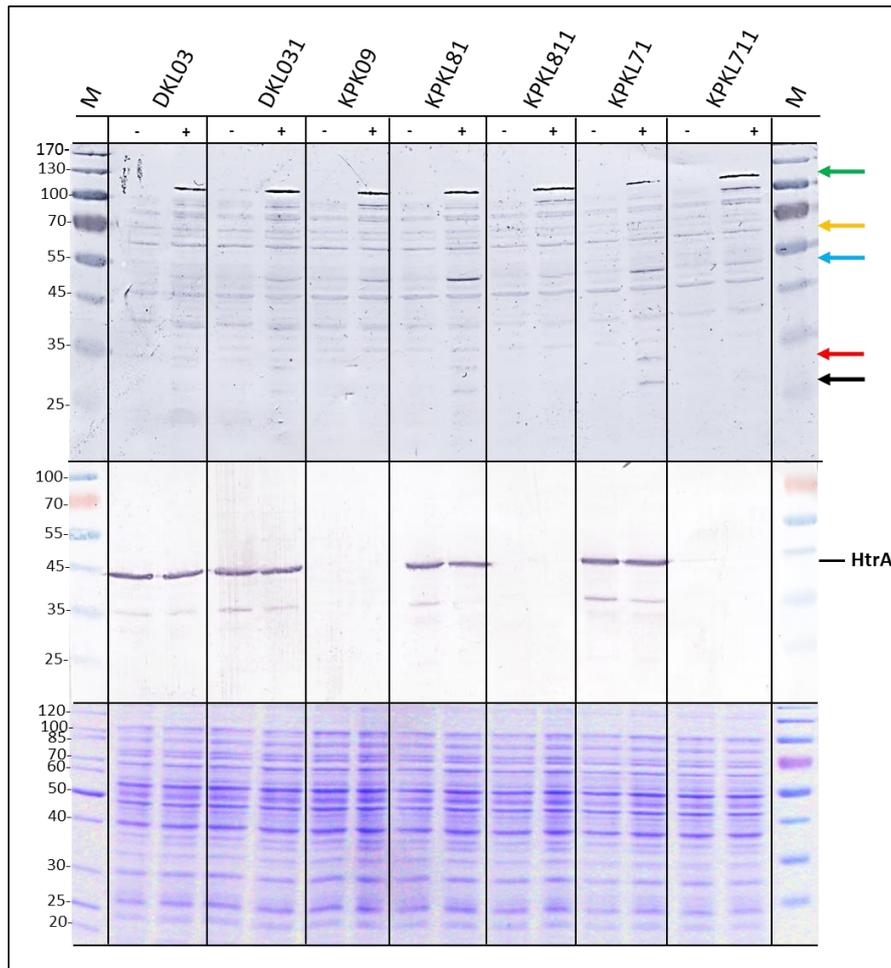


Abb. 3.51: Western-Blotanalyse mit α -GFP- und α -HtrA-Antikörpern in Zellysaten der Stämme DKL03, DKL031, KPKL09, KPKL81, KPKL811, KPKL71 und KPKL711. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegels der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL03 (R6, $P_{c_{zcd}}\text{-gfp-pbp2x}$), DKL031 (DKL03 Δpbp2x), KPKL09 (DKL031 ΔhtrA), KPKL81 (R6, PBP2x L403F, T526S, $P_{c_{zcd}}\text{-gfp-pbp2x}_{C405} \Delta\text{pbp2x}$), KPKL811 (KPKL81 ΔhtrA), KPKL71 (C405, $P_{c_{zcd}}\text{-gfp-pbp2x}_{C405} \Delta\text{pbp2x}$), KPKL711 (KPKL71 ΔhtrA). Auf ein 12,5 % iges SDS-Gel wurden jeweils 5 μl der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl_2 gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt .M: 4 μl Proteinmarker II (PeqLab) (unten). Zwei weitere 12,5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μl (α -GFP-Blot: oben) bzw. 5 μl (α -HtrA-Blot, Mitte) der gleichen Zellysate ebenso beladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen; 1:2.000; oben) bzw. mit dem primären polyklonalen Antikörper α -HtrA 12003 (1:30.000, diese Arbeit; Mitte) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μl Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). Die detektierten GFP-PBP2x-Proteine (ca. 110 kDa, grüner Pfeil) sind markiert. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein gelber Pfeil (ca. 60 kDa), ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine. Die detektierten HtrA-Proteine (ca. 45 kDa) sind ebenfalls gezeigt.

Anhand der gezeigten Western-Blots mit α -HtrA-Antikörpern (Abb. 3.51: Mitte), wird eine erfolgreiche Deletion des Gens *htrA* in den Stämmen KPKL09, KPKL811 und KPKL711 nachgewiesen, da in den Zellysaten dieser Stämme kein HtrA detektiert werden kann. Des Weiteren fällt auf, dass nach Zugabe von ZnCl_2 in den Stämmen DKL031, KPKL71 und KPKL81 geringere Mengen von HtrA

nachgewiesen werden können, als bei den Proben dieser Stämme, denen kein ZnCl_2 zugegeben wurde. Die verringerte Proteinmenge von HtrA ist besonders gut an der schwächer werdenden Abbaubande bei ca. 35 kDa zu erkennen. Möglicherweise wirkt sich die Zugabe von ZnCl_2 negativ auf die HtrA Proteinmenge aus. Andererseits wäre es auch denkbar, dass HtrA, dem nach Zugabe von ZnCl_2 in jedem Stamm ein GFP-PBP2x-Fusionsprotein als Substrat zur Verfügung steht, aktiv ist und sich selbst zum Teil abbaut.

Der Western-Blot mit α -GFP-Antikörpern (Abb. 3.51: oben) wurde besonders lange entwickelt, um möglichst alle Unterschiede in den Abbauprodukten innerhalb der analysierten Stämme zu detektieren. Das Zellysate des Stamms KPKL71 weist eine deutlich geringere Menge an GFP-PBP2_{xC405} auf, als der *htrA*-Deletionsstamm KPKL711. Die Unterschiede in der Menge des GFP-PBP2_{xC405}-Fusionsproteins in den Stämmen KPKL81 und KPKL811 konnte in diesem Western-Blot nicht nachgewiesen werden, da er dafür zu lange entwickelt wurde und der Unterschied aufgrund der Sättigung nicht zu erkennen ist.

Bei den Stämmen KPKL81 und KPKL71 kann ein sehr deutliches Abbauprodukt bei ca. 50 kDa (Abb. 3.51: blauer Pfeil) detektiert werden. In den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL811 und KPKL711 kann dieses Abbauprodukt jedoch nur noch in kleinen Mengen detektiert werden. In den Stämmen KPKL81 und KPKL71 kann ein Abbauprotein bei 35 kDa (roter Pfeil) und ein zusätzlich Abbauprotein bei ca. 26 kDa (schwarzer Pfeil) detektiert werden, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um GFP handelt. In den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL811 und KPKL711 kann keins dieser beiden Abbauproteine nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen Ergebnisse aus bereits beschriebenen Western-Blotanalysen (Abb. 3.48 und Abb. 3.49).

Der Stamm DKL031 weist alle drei zuvor beschriebenen Abbauprodukte auf (ca. 26 kDa, ca. 35 kDa und ca. 60 kDa), jedoch in geringeren Mengen. In dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 kann dagegen nur noch das Abbauprodukt bei ca. 60 kDa in gleicher Menge detektiert werden. Die beiden anderen Abbauprodukte können im Stamm KPKL09 nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse beweisen, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2x in den Stämmen DKL03 und DKL031 ebenfalls von der Serinprotease HtrA abgebaut wird. Eine mögliche Auswirkung der Deletion von *htrA* auf die Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins wurde untersucht. Hierfür wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen mit dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 3.52 zu sehen. Die Lokalisation des GFP-PBP2x entspricht der zuvor gezeigten Stämme DKL03 und DKL031, da eine Lokalisation am Zellseptum deutlich wird. Allerdings scheint sich das Fluoreszenzsignal in einigen Zellen ausschließlich in der Membran zu lokalisieren.

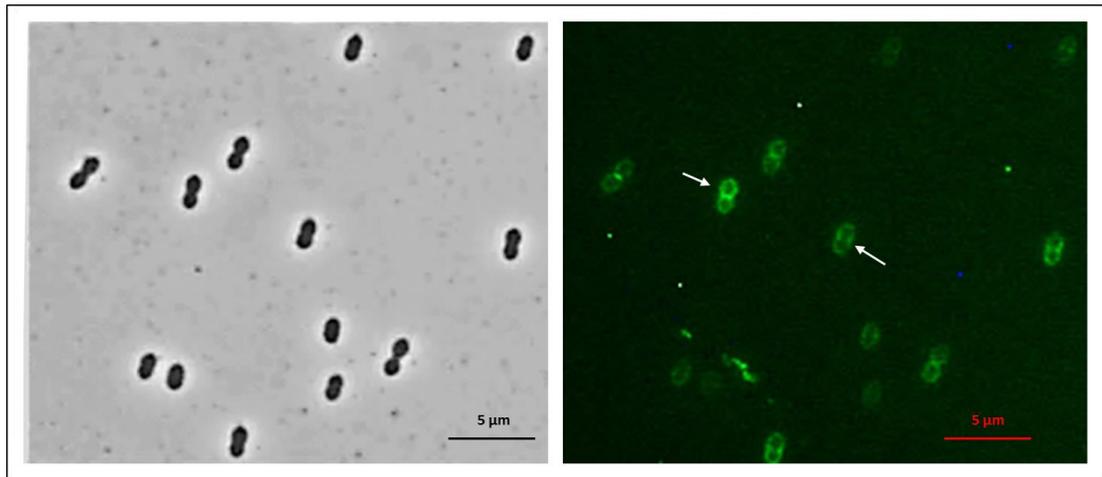


Abb. 3.52: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. pneumoniae* KPKL09. Die Phasenkontrastaufnahme der Zellen von DKL09 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x* Δ *pbp2x* Δ *htrA*) ist links und die Fluoreszenzaufnahme ist auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL811, KPKL711 und DKL09

Die ermittelten Ergebnisse der Lokalisationsstudien der Stämme *S. pneumoniae* KPKL811, KPKL711 und DKL09, wurden in einer statistischen Analyse objektiv analysiert und vergleichend in Abb. 3.53 dargestellt. Dabei wurden die Zellen, wie bereits zuvor beschrieben (Kap. 3.8.2.1) in identische Kategorien unterteilt. Für den Stamm DKL09 wurden hierfür insgesamt 315, für KPKL811 insgesamt 637 und für KPKL711 insgesamt 379 fluoreszierende Zellen ausgewertet. Die Stämme wiesen 2,2-20,1 % unklare Profile auf.

Insgesamt 66,5 % der Zellen des Stamms KPKL09 wiesen eine septale Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins auf. Im Vergleich dazu waren es in seinem Parentalstamm DKL031, der die Serinprotease HtrA besaß, 84,1 % der Zellen (Abb. 3.46). Der Stamm KPKL09 wies unabhängig von seinem Zellteilungsstadium, ein zusätzliches Profil auf. Dabei lokalisierte sich das Fluoreszenzsignal ausschließlich in der Membran. Ein Anteil von 18,5 % der KPKL09 Zellen wies dieses zusätzliche Profil auf. Demnach wirkte sich die Deletion der Serinprotease HtrA in diesem Stamm eindeutig auf die Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins aus.

Anhand der statistischen Auswertung zeigte sich für den Stamm KPKL811, dass 58,4 % der Zellen dieses Stamms eine septale Lokalisation des GFP-PBP2_{C405}-Fusionsproteins an den Tag legten. Im Vergleich zu dem Parentalstamm KPKL81 (43,1 %) kam es demnach nach der Deletion von *htrA* zu einer Steigerung der septal bzw. äquatorial lokalisierten Zellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Western-Blotanalysen überein, wonach in dem Stamm KPKL811 deutlich weniger Abbauprodukte vorliegen.

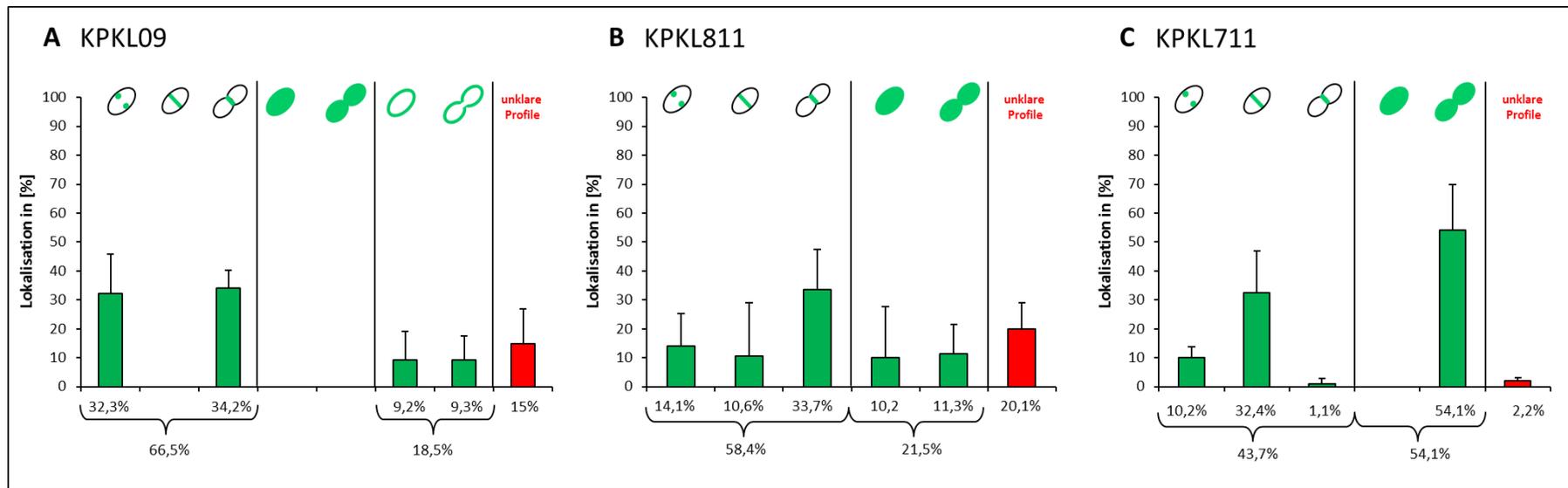


Abb. 3.53: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL09, KPKL811 und KPKL711. Dargestellt sind die statistischen Auswertungen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* KPKL09 (R6, $P_{czcD}\text{-}gfp\text{-}pbp2x \Delta pbp2x \Delta htrA$) (A), KPKL811 ($P_{czcD}\text{-}gfp\text{-}pbp2x_{C405} \Delta pbp2x \Delta htrA$) (B) und KPKL711 (C405, $P_{czcD}\text{-}gfp\text{-}pbp2x_{C405} \Delta pbp2x \Delta htrA$) (C) im Vergleich. Für jede statistische Auswertung wurden jeweils drei mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen, die aus zwei unabhängigen Experimenten stammen, ausgezählt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Stämme zuvor in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von $N 120$ angezogen. Nicht fluoreszierende Zellen wurden in den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ermittelten Lokalisation des jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionsproteins sind als grüne Balken dargestellt und in [%] angegeben. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die Mittelwerte der unklaren Profile sind als rote Balken dargestellt und in [%] angegeben. Septale bzw. äquatoriale Lokalisation des Fusionsproteins: : kokkale Zelle; Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins erscheint an zwei Stellen. : kokkale Form; Fluoreszenzsignal zeigt sich als Linie in der Zellmitte. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle ist zu erkennen; Fluoreszenzsignal wird am Septum detektiert. Zytoplasmatisch leuchtende Zellen: : kokkale Form. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle am Septum

Die statistische Auswertung der Fluoreszenzsignale des *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 zeigte, dass sich 43,7 % der Zellen septal lokalisierten und 54,1 % der Zellen ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal aufwiesen. Im Vergleich zu dem Parentalstamm mit funktionierender Serinprotease HtrA stiegen die Anteile der septal lokalisierten GFP-PBP2x_{C405}-Proteine von 14,9 % auf 43,7 % deutlich an (Abb. 3.46). Weiterhin sank auch der Anteil an Zellen, die komplett leuchteten von 80,3 % auf 54,1 %. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Serinprotease HtrA in der Lage ist, sowohl GFP-PBP2x_{C405}, als auch GFP-PBP2x abzubauen, was sich in jedem Fall mehr oder weniger auch auf die Lokalisation auswirkt. Aufgrund des Abbaus durch HtrA befinden sich die Abbauprodukte im Zytoplasma der Zelle und enthalten ein intaktes GFP, da sie mit α -GFP-Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Daher kommt es zu einem zytoplasmatischen, grün leuchtenden Fluoreszenzsignal, das sich über die komplette Zelle erstreckt. Sobald HtrA aufgrund der Deletion in der Zelle nicht mehr vorhanden ist, wird das jeweilige Fusionsprotein nicht mehr abgebaut und das zytoplasmatische Leuchten verschwindet. Dabei können möglicherweise verdeckte korrekte Fluoreszenzsignale zu Tage kommen.

3.9 Depletionsexperimente mit GFP-PBP2x und GFP-PBP2x_{C405}

Die Rolle des essentiellen PBP2x aus *S. pneumoniae* R6 und C405 bei der Zellteilung sollte näher untersucht werden. Die Stämme DKL031, KPKL71 und KPKL81, die jeweils lediglich eine konditionale ektopisches *gfp-pbp2x* aus R6 bzw. *gfp-pbp2x*_{C405} beinhalten, das wiederum unter der Kontrolle des zinkinduzierbaren Systems steht, wurden daher anhand von Depletionsexperimenten untersucht. Die Transkription der jeweiligen *gfp-pbp2x*-Fusion kann durch Verringerung der ZnCl₂-Konzentration vermindert bzw. gestoppt werden, was sich wiederum auf das Bakterienwachstum und die Zellmorphologie auswirkt.

Das jeweilige GFP-PBP2x-Fusionsprotein der Stämme wurde innerhalb der durchgeführten Depletionsexperimenten durch das Wachstum in C-Medium ohne Zugabe von ZnCl₂ dezimiert und das Wachstumsverhalten auf Unterschiede hin untersucht. Dafür wurden zunächst Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ erstellt. Sobald diese die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurde das ZnCl₂ ausgewaschen und die Zellen in einer 1:20 Verdünnung in dem gleichen Volumen an C-Medium ohne zusätzliches ZnCl₂ resuspendiert (Kap. 2.6.3.2). Das Wachstum der Stämme DKL031, KPKL71 und KPKL81 wurde in regelmäßigen Abständen verfolgt und verglichen. Als Kontrolle wurden die Stämme *S. pneumoniae* R6 und C405 ebenso behandelt und das Wachstum ebenfalls untersucht. Die Abb. 3.54 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen und in Tab. 3.7 sind die ermittelten Generationszeiten der Stämme zu finden.

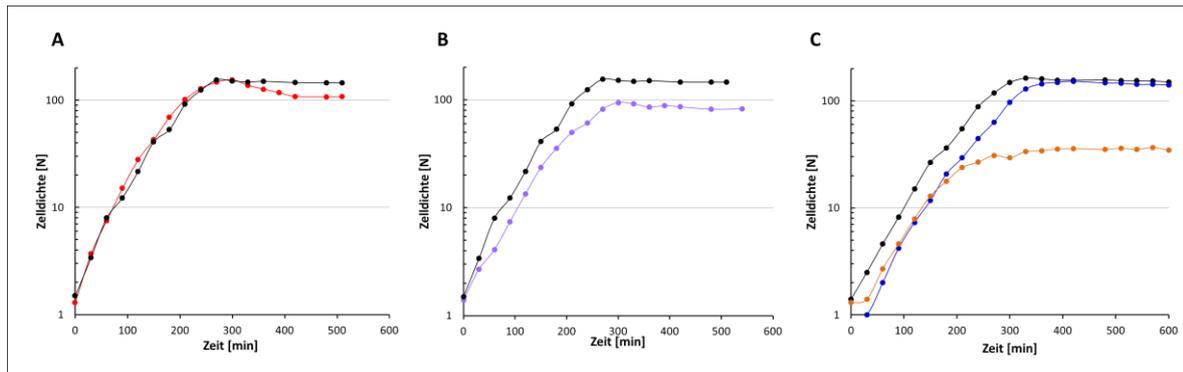


Abb. 3.54: Wachstum von *S. pneumoniae* DKL031, KPKL81 und KPKL71 in Abwesenheit von Zn^{2+} . **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* DKL031 (R6, $P_{czcD-gfp-pbp2x} \Delta pbp2x$) und R6. **B:** Wachstumskurven von KPKL81 (R6, PBP2x L403F, T526S, $P_{czcD-gfp-pbp2x} C405 \Delta pbp2x$) und R6. **C:** Wachstumskurven von KPKL71 ($C405, P_{czcD-gfp-pbp2x} C405 \Delta pbp2x$) und den Stämmen R6 und C405 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: R6, ●: DKL031, ●: KPKL81, ●: C405, ●: KPKL71.

Tab. 3.7: Generationszeiten der Stämme *S. pneumoniae* R6, DKL031, KPKL81, C405 und KPKL71 nach dem Überimpfen in C-Medium bei 30 °C.

Stamm	g^* [min]
R6	43
DKL031	44
KPKL81	52
C405	52
KPKL71	52

*g: Generationszeit: Die Generationszeit wurde anhand der in Abb. 3.54 dargestellten Wachstumskurven rechnerisch ermittelt.

In Abb. 3.54 A ist das Wachstumsverhalten von R6 und dem Stamm DKL031 in Abwesenheit von Zn^{2+} zu sehen. Beide Stämme wachsen mit einer nahezu identischen Generationszeit (R6: 43 min; DKL031: 44 min) und erreichen nach ca. 270 min eine gleiche maximale Zelldichte von 155 N. Der Stamm DKL031 (Abb. 3.54 A), der ein konditionelles GFP-PBP2x besitzt, geht allerdings nach ca. 1 h in der stationären Wachstumsphase in die Lyse über; wohingegen der Kontrollstamm *S. pneumoniae* R6 (Abb. 3.54) stationär bleibt. Dieses Ergebnis belegt eine langsame Abnahme an GFP-PBP2x in dem Stamm DKL031 während des Wachstums der Zellen im C-Medium.

Das C-Medium, das für die Durchführung der Depletionsexperimente verwendet wurde, besitzt eine geringe Zn^{2+} -Konzentration von 1,5 nM. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass diese geringe Konzentration des Induktors für das Überleben der DKL031 Zellen nicht ausreicht, da die Expression von *gfp-pbp2x* nicht stark genug ist (Stahlmann, 2011). Demnach haben die Zellen des Stamms DKL031 aus der Vorkultur eine ausreichende Menge des Fusionsproteins GFP-PBP2x synthetisiert, die während des Wachstums jeweils auf die Tochterzellen verteilt wird, so dass der Stamm DKL031 in der Lage ist ebenso schnell wie R6 zu wachsen und sogar die gleiche maximale Zelldichte zu erreichen. Die früher

einsetzende Lyse bei dem Stamm DKL031 beweist, dass die Dezimierung an GFP-PBP2_x zu diesem Zeitpunkt bereits fortgeschritten war, da sich dies auf das Wachstumsverhalten negativ auswirkt.

Der Stamm KPKL81 besitzt lediglich eine ektopisches konditionelles *gfp-pbp2_xC405*, das zwei Punktmutationen in *pbp2_x* beinhaltet, die wiederum zu den möglicherweise destabilisierenden Aminosäureaustausche L403F und T526S in PBP2_x führen. Anhand von Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern wurde bereits gezeigt, dass dieser Stamm unter induzierten Bedingungen eine geringere Menge an GFP-PBP2_xC405 besitzt, da dieses durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird (Kap. 3.8.3). Um eine mögliche Auswirkung der verringerten Menge des veränderten Fusionsproteins auf die Zellteilung und das Wachstum zu untersuchen, wurden mit diesem Stamm ebenfalls Depletionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde verfahren wie bereits beschrieben. Die Abb. 3.54 B veranschaulicht die Ergebnisse dieser Analysen. Die verringerte Menge des GFP-PBP2_xC405-Fusionsproteins wirkt sich deutlich negativ auf das Wachstumsverhalten während des Depletionsexperiments aus. Der Stamm KPKL81 wächst im Vergleich zu R6 und DKL031 mit einer deutlich langsameren Generationszeit von 52 min und erreicht eine merklich geringere maximale Zelldichte von 94,3 N.

Der Stamm KPKL71 beinhaltet ein ektopisches konditionelles *gfp-pbp2_xC405* im genetischen Hintergrund von C405 und besitzt daher das *ciaH305*-Allel. Auch für diesen Stamm wurde anhand von Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern eine deutlich geringere Menge an GFP-PBP2_xC405 unter induzierten Bedingungen nachgewiesen, was wiederum auf die Serinprotease HtrA zurückgeführt werden konnte (Kap. 3.8.3). Aufgrund des *ciaH305*-Allels liegt HtrA in C405 in erhöhter Menge vor und bewirkt daher einen stärkeren Abbau. Eine mögliche Konsequenz auf die Zellteilung und das Wachstum wurde in dem Stamm KPKL71 mittels Depletionsexperimente analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.54 C zu finden. Als Kontrollen dienten die Stämme *S. pneumoniae* R6 und C405. Der Laborstamm C405 wies mit 52 min eine im Vergleich zu R6 verlängerte Generationszeit auf, erreichte jedoch nahezu die gleiche maximale Zelldichte und blieb stationär. Bei dem Stamm KPKL71 war dagegen ein deutlicher Wachstumsdefekt zu verzeichnen, da er nachdem Erreichen einer deutlich niedrigeren maximalen Zelldichte von 35,7 N direkt in die stationäre Wachstumsphase übergang. Seine Generationszeit beträgt, ebenso wie bei C405 52 min.

Anhand dieser Depletionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die drei konditionalen Stämme DKL031, KPKL81 und KPKL71 eine stufenweise Verschlechterung des Wachstumsverhaltens aufwiesen, was auf die Dezimierung des jeweiligen Fusionsproteins zurückzuführen ist. Aufgrund der verringerten Menge des GFP-PBP2_x-Fusionsproteins in KPKL81 ist der auftretende Wachstumsdefekt in stärkerer Form ausgeprägt als in DKL031. In dem Stamm KPKL71 wurde eine weitere Verschlechterung des Wachstumsverhaltens beobachtet; was wiederum auf den genetischen Hintergrund von C405 zurückzuführen ist.

3.9.1 Die Verringerung an GFP-PBP2x in DKL031 führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen und zum Wachstumsstopp

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Depletion des GFP-PBP2x-Fusionsproteins auf die Zellmorphologie des konditionalen Stammes DKL031 untersucht. Für diesen Stamm wurde die Anzahl an Generationen ermittelt, die dieser in Abwesenheit des Induktors überleben konnte. Ferner wurde getestet, ob die sterbenden Zellen des konditionalen Stammes DKL031 innerhalb eines Depletionsexperiment nach Zugabe von 0,15 mM $ZnCl_2$ in der Lage waren sich zu erholen und somit wieder eine normale Zellmorphologie und ein normales Wachstumsverhalten aufzuweisen.

Das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie des Stammes DKL031 wurde in weiterführenden Depletionsexperimenten zu Abb. 3.54 untersucht. Der Stamm *S. pneumoniae* R6 wurde als Kontrolle mitgeführt und auf die gleiche Weise analysiert. Anhand von Abb. 3.55 wird deutlich, dass sowohl R6, als auch DKL031 nach dem Auswaschen des Induktors und einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ein exponentielles Wachstum aufweisen. An den mit 1 und 2 markierten Zeitpunkten wurden den wachsenden Kulturen Proben entnommen und die Morphologie der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie eingehend untersucht. Jeweils drei repräsentative Phasenkontrastaufnahmen pro Stamm und Zeitpunkt sind in Abb. 3.55 B zu sehen. Nach fünf Generationen (150 min) Wachstum ohne Anwesenheit des Induktors (entspricht Zeitpunkt 1 in Abb. 3.55) zeigten sich bei dem Stamm DKL031 leichte Unterschiede in der Zellmorphologie. Die Längen der Zellen der beiden Stämme zum Zeitpunkt 1 wurden mit Hilfe der Nikon Imaging Software Nis Elements BR (Version 3.2) gemessen. Diese Analyse der Zelllängen offenbarte, dass der Stamm DKL031 bereits nach fünf Generationen Wachstum ohne Induktor verlängerte Zellen aufwies. Während *S. pneumoniae* R6 Zelllängen von $1,07 \pm 0,14 \mu\text{m}$ (insgesamt 68 Zellen gemessen) zeigte, waren die Zellen des Stammes DKL031 mit $1,26 \pm 0,11 \mu\text{m}$ (insgesamt 23 Zellen vermessen) deutlich größer.

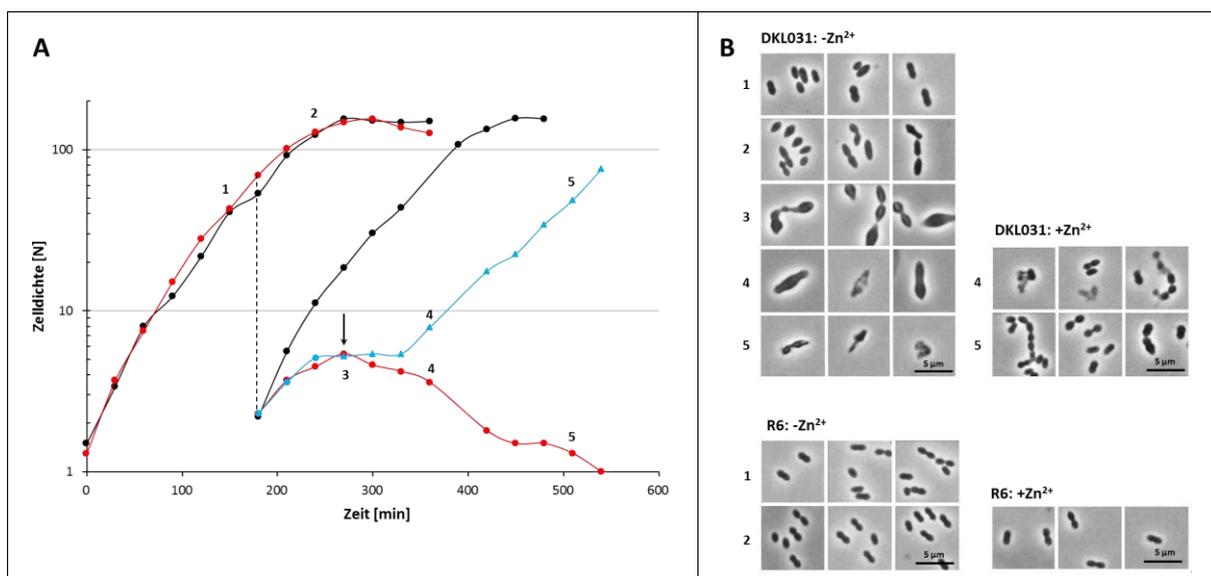


Abb. 3.55: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* DKL031 in Abwesenheit von Zn^{2+} . **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* DKL031 (R6, $P_{czcD-gfp-pbp2x} \Delta pbp2x$) und dem Kontrollstamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: R6, ●: DKL301. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt (gestrichelte Linie) und beim Erreichen der stationären Phase mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) induziert. ●: DKL301 vor der Induktion, ▲: DKL301 nach der Induktion, ●: DKL301 ohne Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-5 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* DKL301 im Vergleich zu R6. Pro Zeitpunkt (1-5) sind jeweils 3 mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 µm) ist angegeben.

Nach weiteren 3 h Wachstum (Abb. 3.55, Zeitpunkt 2, nach 240 min) befanden sich beide untersuchte Stämme bereits in der späten exponentiellen Wachstumsphase und der Stamm DKL031, der bereits 6,5 h ohne Induktor wuchs, wies eindeutig eine noch weiter verlängerte Zellmorphologie auf. Für den Stamm DKL031 wurden Zelllängen von $1,54 \pm 0,34$ µm dokumentiert (insgesamt 38 Zellen gemessen); dagegen zeigten die R6 Zellen zu diesem Zeitpunkt Zelllängen von $1,02 \pm 0,13$ µm (insgesamt 119 Zellen vermessen).

Um eine komplette Depletion von GFP-PBP2x durchführen zu können, wurden zwei Proben der exponentiell wachsenden Kulturen mit einer Zelldichte von 70 N in einer weiteren 1:20 Verdünnung erneut in C-Medium überführt, das Wachstum und die Zellmorphologie der Zellen weiter untersucht.

Der Stamm R6 wuchs nach dem Überimpfen mit einer Generationszeit von 43 min an, lag überwiegend in Diplokokken vor und zeigte keinerlei morphologische Auffälligkeiten (Abb. 3.55 B, Zeitpunkt 3). Dagegen wuchsen die beiden Proben des Stamms DKL031 eine Generation bis zu einer maximalen Zelldichte von 5,2 N, danach stoppte das Wachstum. Demnach war der Stamm DKL031 in der Lage insgesamt sieben Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, bis sich ein Wachstumsstopp einstellte. Die Morphologie dieser DKL031 Zellen, die nicht mehr in der Lage waren sich zu teilen, wurden mikroskopisch untersucht (Abb. 3.55 B, Zeitpunkt 3). Dabei offenbarten sich Zellen, die keine typische kokkale Form mehr aufwiesen, sondern stark vergrößert und ungleichmäßig deformiert waren. Neben der starken Verlängerung der Zellen (ca. um das 3fache des normalen Zellvolumens) wiesen diese zusätzlich eine aufgeblähte Form mit ausgeprägten Ausbuchtungen auf.

Eine Probe des Stamms DKL031 (Abb. 3.55 A) wurde nach dem Erreichen der stationären Phase weitere 270 min inkubiert und die morphologischen Veränderungen analysiert. Das Sterben dieser DKL031 Zellen zeigt sich anhand der eintretenden Lyse. Die Morphologie der Zellen verschlechterte sich zunehmend (Abb. 3.55 B, Zeitpunkt 4 und 5), da neben noch weiter verlängerten Zellen auch deutlich Zellreste zu sehen waren. Bereits 240 min nach dem eintretenden Wachstumsstopp von DKL031 (Abb. 3.55 B, Zeitpunkt 5) zeigten die phasenkontrastmikroskopischen Analysen hauptsächlich kaputte Zellen und Zelltrümmer. In Abb. 3.56 sind die Phasenkontrastaufnahmen des in Abb. 3.55 dargestellten Depletionsexperiments in vergrößerter Form zu sehen. Die beschriebene Morphogenese der Zellen von *S. pneumoniae* DKL031 in Abwesenheit von Zn^{2+} ist anschaulich dargestellt.

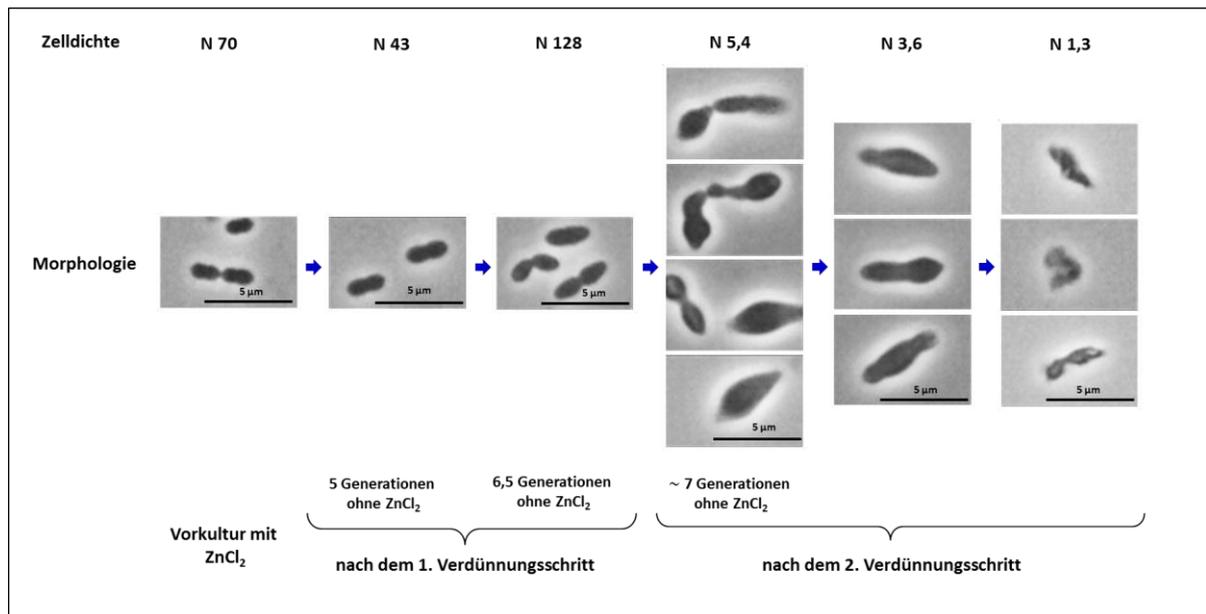


Abb. 3.56: Morphogenese der Zellen von *S. pneumoniae* DKL031 in Abwesenheit von Zn^{2+} . Dargestellt sind die Ergebnisse der phasenmikroskopischen Analyse von *S. pneumoniae* DKL031 (R6, $P_{czd}-gfp-pbp2x \Delta pbp2x$) während des in Abb. 3.56 gezeigten Depletionsexperiments. Das erste Bild von links zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der Vorkultur mit $ZnCl_2$ des Stamms DKL031. Ab dem zweiten mikroskopischen Bild von links sind die Phasenkontrastbilder, die während der Zeitpunkte 1-5 (Abb. 3.55) aufgenommen wurden in vergrößerter Form zu sehen. Das Wachstum der untersuchten Kultur in Medium ohne $ZnCl_2$ ist in Generationen angegeben. Die Zelldichten der Proben und der Maßstab (5 μm) sind ebenfalls gezeigt.

Um zu analysieren, ob es sich bei der Deformierungen der Zellen und dem Wachstumsstopp um einen reversiblen Prozess handelt, wurde die zweite Probe des Stamms DKL031 (Abb. 3.55 A) nach dem Erreichen der stationären Phase mit 0,15 mM $ZnCl_2$ induziert und das Wachstum und die Zellmorphologie weitere 270 min beobachtet. Der Stamm DKL031 wies bereits 1 h nach der Induktion ein deutliches Wachstum mit einer Generationszeit von 51 min auf. Die Morphologie der Zellen wurde 1,5 h nach der Induktion untersucht (Abb. 3.55, Zeitpunkt 4). Vereinzelt waren noch Zelltrümmer, Zellreste und deformierte Zellen zu erkennen, allerdings konnten deutlich kleinere Zellen mit einer normaleren Morphologie nachweisen werden. Auch 4 h nach der Induktion mit Zn^{2+} zeigten sich noch einige deformierte Zellen. Die Mehrheit der DKL031 Zellen lies jedoch eine zu R6 identische Morphologie erkennen. Demnach wurde das GFP-PBP2x in nahezu ausreichenden Mengen produziert um, sowohl den Wachstums-, als auch den morphologischen Defekt größtenteils zu kompensieren.

Die ermittelten Ergebnisse wurden in vier unabhängigen Depletionsexperimenten mit dem Stamm DKL031 bestätigt. Die maximal möglichen Generationen, die DKL031 ohne $ZnCl_2$ wachsen konnte, schwankten dabei, je nach Charge C-Medium, leicht zwischen 6,5 - 7,5 Generationen. Durch die dargestellten Ergebnisse wurde bewiesen, dass PBP2x neben der essentiellen Rolle während der Zellteilung, auch für das Wachstum der Zellen, als auch für die Aufrechterhaltung der Zellform von graviegender Bedeutung ist.

3.9.2 Depletionsexperimente mit den konditionalen GFP-PBP2_{x_{C405}}-Stämmen KPKL71 und KPKL81 und die Rolle der Serinprotease HtrA

In diesem Kapitel wird die Auswirkung der vollständigen Depletion der GFP-PBP2_{x_{C405}}-Fusionsproteine auf die Zellmorphologie und das Wachstumsverhalten den konditionalen Stämmen KPKL71 und KPKL81 untersucht und für jeden Stamm die Anzahl an Generationen ermittelt, die dieser in Abwesenheit des Induktors überleben konnte.

Die Stämme KPKL81 und vor allem KPKL71 weisen bereits unter induzierten Bedingungen, also in den Vorkulturen, eine deutlich geringere Menge an GFP-PBP2_{x_{C405}} auf (Kap. 3.8.3). Demzufolge müssten die Generationen, die die KPKL81- und vor allem die KPKL71-Zellen ohne Induktor wachsen können im Vergleich zu DKL031 auch geringer sein. Denn je geringer die Menge des Fusionsproteins in der Vorkultur ist, desto kleiner müsste die Anzahl an Generationen sein, die die Zellen unter nicht-induzierten Bedingungen davon zehren können.

Es wurde bereits gezeigt, dass sich durch das Fehlen der Serinprotease HtrA die Menge an GFP-PBP2_{x_{C405}}-Fusionsproteinen in den beiden Stämmen erhöht (Kap. 3.8.3, Abb. 3.47 und Abb. 3.48), was sich wiederum in den Lokalisationsstudien positiv bemerkbar macht (Kap. 3.8.3, Abb. 3.53).

Mit den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL711 und KPKL811 wurden daher ebenfalls Depletionsexperimente durchgeführt, um zu analysieren, ob sich die im Vergleich zu KPKL71 und KPKL81 erhöhte Mengen an GFP-PBP2_{x_{C405}} in den Vorkulturen wie erwartet vorteilhaft auf das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie auswirken. Des Weiteren wurde getestet, ob die sterbenden Zellen all dieser konditionalen Stämme innerhalb der Depletionsexperiment nach Zugabe von 0,15 mM ZnCl₂ in der Lage waren sich zu erholen und somit erneut eine normale Zellmorphologie und ein normales Wachstumsverhalten aufzuweisen.

In Abb. 3.57 ist ein unabhängiges Depletionsexperiment des Stamms KPKL71 zu sehen. Der Ursprungsstamm C405 (Abb. 3.57), der als Kontrolle mit analysiert wurde, wächst mit einer Generationszeit von 56 min und erreicht nach 420 min eine maximale Zelldichte von 160 N. Dies entspricht, bis auf eine etwas längere Generationszeit, den Ergebnissen aus Abb. 3.55. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zellen des Laborstamms C405 offenbaren, sowohl während der frühen (Abb. 3.57, Zeitpunkt 1), als auch während der späten exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 3.57, Zeitpunkt 2) normale Diplokokken und kurze Ketten. Die Zellen sind jedoch im Vergleich zu DKL031 und R6 kleiner; dies wurde allerdings bereits zuvor erläutert (Kap. 3.4).

Der konditionelle Stamm KPKL71 (Abb. 3.57) erreicht nach 4 h Wachstum mit einer maximalen Zelldichte von ca. 20 N bereits die stationäre Wachstumsphase und bleibt auch nach 630 min stationär. Der Stamm KPKL71 ist in der Lage vier Generationen ohne Induktor zu wachsen; demnach stellt sich bereits zwei Generationen früher als bei dem Stamm DKL031 ein Wachstumsstopp ein. Auch diese Daten entsprechen denen in Abb. 3.55. Die Analyse der Zellmorphologie des Stamms KPKL71 zeigt sowohl am Zeitpunkt 1, als auch am Zeitpunkt 2 stark deformierte Zellen. Die Verformungen entspre-

chen, mit stark verlängerten und aufgeblähten Zellen, der bereits für DKL031 beschriebenen Morphologie in Abwesenheit von Zn^{2+} (Kap. 3.9.1, Abb. 3.56). Die Analyse der Morphologie der KPKL71 Zellen offenbaren nach 9 h in Abwesenheit von $ZnCl_2$ zwar bereits einige Zelltrümmer und Zellreste (Abb. 3.57, Zeitpunkt 3); es zeigt sich anhand des Wachstums jedoch keine eintretende Lyse. Da der Stamm KPKL71 den genetischen Hintergrund des Laborstamms C405 und somit neben dem *ciaH305*-Allel möglicherweise weitere unbekannte Mutationen besitzt, ist es denkbar, dass die Lyse aufgrund einer dieser Mutationen verhindert wird, da für den Laborstamm C405 ebenfalls eine verlängerte stationäre Wachstumsphase nachgewiesen wurde (Kap. 3.4, Abb. 3.15).

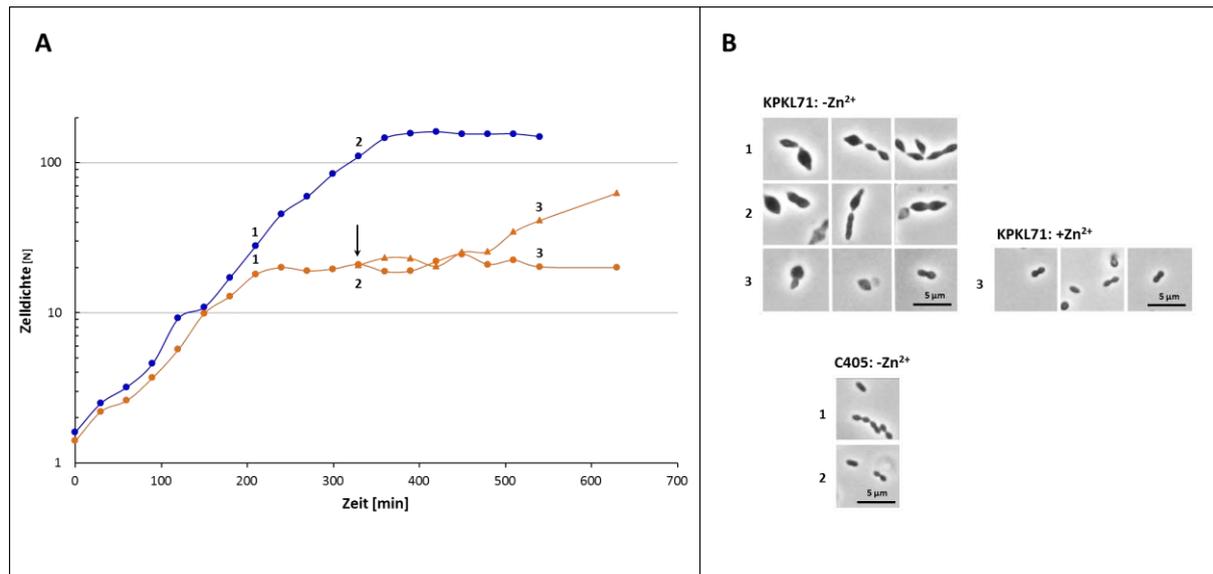


Abb. 3.57: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL71 in Abwesenheit von Zn^{2+} . **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL71 (C405, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*_{C405} Δ *pbp2x*) und dem Parentalstamm C405 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: C405, ○: KPKL71. Der Induktionszeitpunkt mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) ist angezeigt: ↓. ○: KPKL71 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: KPKL71 nach der Induktion. Die Zahlen 1-3 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL71 im Vergleich zu C405. Pro Zeitpunkt (1-3) sind jeweils 1-3 mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μ m) ist angegeben.

Eine zweite Probe des Stamms KPKL71 (Abb. 3.57) wurde nach 2 h in der stationären Phase mit 0,15 mM $ZnCl_2$ induziert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen bereits durch die Dezimierung von GFP-PBP2_{C405} stark verformt (Abb. 3.57, Zeitpunkt 2). Ungefähr 2,5 h nach Zugabe des Induktors war bereits ausreichend GFP-PBP2_{C405} vorhanden, so dass der Beginn des erneuten Wachstums des Stamms KPKL71 zu vermerken war. Anhand von morphologischen Untersuchungen, die 3,5 h nach der Induktion durchgeführt wurden (Zeitpunkt 3), konnte eine überwiegend normale kokkale Morphologie für die KPKL71 Zellen nachgewiesen werden.

In der Abb. 3.58 sind die Ergebnisse eines Depletionsexperiment des *htrA*-Deletionsstamms KPKL711 zu sehen. Das Wachstum des Stamm KPKL711 wurde zeitgleich mit seinem Parentalstamm KPKL71 und dem Laborstamm C405 im gleichen Depletionsexperiment analysiert; aus Gründen der Übersichtbarkeit wurden diese jedoch getrennt dargestellt.

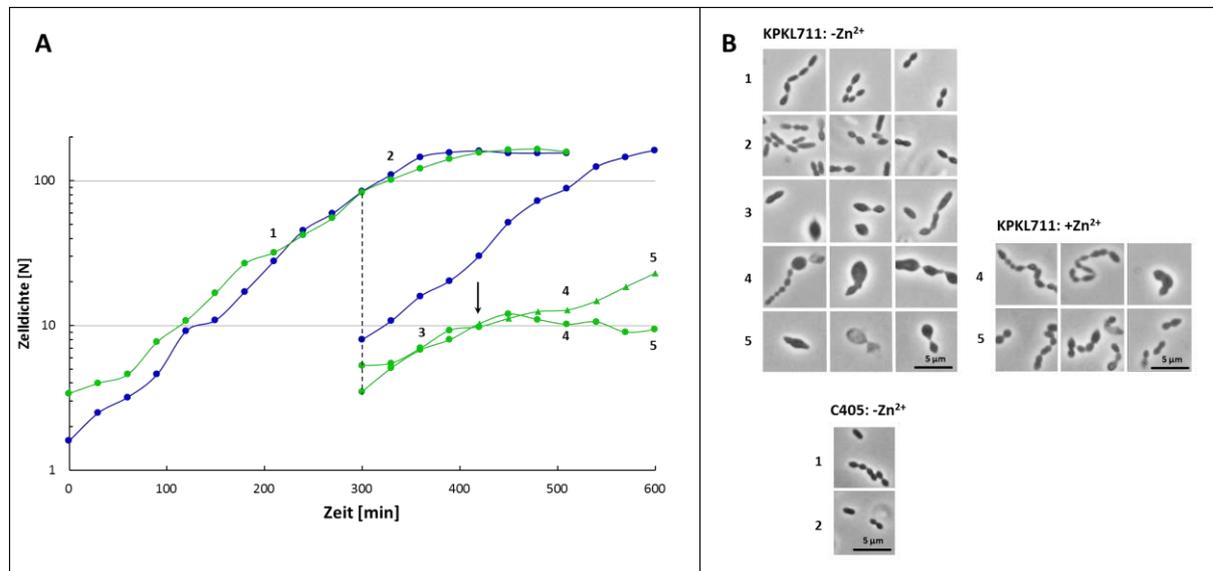


Abb. 3.58: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL711 in Abwesenheit von Zn^{2+} . **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL711 (C405, P_{cscD} - gfp - $pbp2x_{C405}$ $\Delta pbp2x$ $\Delta htrA$) und dem Stamm C405 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: C405, ●: KPKL711. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt und beim Erreichen der stationären Phase mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) induziert. ●: KPKL711 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: KPKL711 nach der Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-5 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL711 im Vergleich zu C405. Pro Zeitpunkt (1-5) sind jeweils drei mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μm) ist angegeben.

Der Kontrollstamm C405 wuchs nach dem Auswaschen von $ZnCl_2$ und dem ersten Überimpfen in C-Medium, wie bereits zuvor beschrieben, mit einer Generationszeit von 56 min an. Sobald dieser Stamm eine Zelldichte von 70 N erreicht hatte, wurde er erneut 1:20 in C-Medium verdünnt; erneut wuchs C405 mit einer Generationszeit von 56 min an. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 wuchs nach dem ersten Überimpfen in C-Medium mit einer Generationszeit von 65 min, die im Vergleich zu C405 deutlich länger ist, an und erreichte mit 165 N eine gleich hohe Zelldichte wie der Laborstamm C405. Morphologische Analysen des Stamms KPKL711 während der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 3.58: Zeitpunkt 1 und 2) offenbarten im Vergleich zu C405 leicht verlängerte Zellen, die als Diplokokken und in kurzen Ketten vorlagen. Sobald der Stamm KPKL711 eine Zelldichte von 70 N erreicht hatte, wurde er erneut in C-Medium ohne zusätzliches $ZnCl_2$ überführt. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 war in der Lage zwei weitere Generationen zu wachsen, bevor sich ein

Wachstumsstopp bei einer Zelldichte von 12 N einstellte. Die Morphologie der Zellen wurde 1 h nach dem Überführen in C-Medium und somit vor dem eintretenden Wachstumsstopp untersucht (Abb. 3.58: Zeitpunkt 3). Die Zellen waren deutlich verformt und wiesen, sowohl eine Verlängerung, als auch deutliche seitliche Ausbuchtungen auf. Somit war die GFP-PBP2_{x_{C405}}-Menge in den Zellen soweit dezimiert, dass sich dies bereits negativ auf die Zellmorphologie auswirkte, wohingegen der Wachstumsstopp etwas später eintrat. Insgesamt war des *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 in der Lage ca. 6,5 Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen. Dies ist vergleichbar mit der Anzahl der Generationen, die der Stamm DKL031 in Abwesenheit von ZnCl_2 wachsen konnte. Es war demnach eine deutliche Verbesserung des Wachstumsverhaltens im Vergleich zu dem Parentalstamm KPKL71 zu erkennen, da der Stamm KPKL711 in der Lage war 2,5 Generationen länger zu wachsen. Die phasenkontrastmikroskopischen Analysen zeigten 1 h nach dem Eintreten des Wachstumsstopps von KPKL711 stark verformte, heteroge Zellen (Abb. 3.58, Zeitpunkt 4). Bereits 2,5 h nach dem Wachstumsstopp konnten vereinzelt geschrumpfte Zellen und Zelltrümmer nachgewiesen werden; allerdings zeigte sich auch bei dem Stamm KPKL711, ebenso wie bei KPKL71, keine eintretenden Lyse; vielmehr befanden sich die Zellen auch nach 600 min in der stationären Phase.

Eine Probe des Stamms KPKL711 wurde mit $0,15 \text{ mM ZnCl}_2$ induziert, sobald dieser die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte (Abb. 3.58). Ungefähr 1,5 h nach der Induktion konnte ein deutlich einsetzendes Wachstum registriert werden. Anhand der dokumentierten mikroskopischen Aufnahmen konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine teilweise Normalisierung der Zellmorphologie dokumentiert werden (Abb. 3.58: Zeitpunkt 4). Neben deutlich kleineren Zellen wurde allerdings auch eine vermehrte Kettenbildung festgestellt. Dabei waren die Zellen nicht identisch groß. Zum Zeitpunkt 5, der 3 h nach der Induktion entspricht, wurde eine weitere Verbesserung der Zellmorphologie verzeichnet, wobei eine komplette Rückbildung der Zellmorphologie zur normalen Form noch nicht beobachtet werden konnte.

In Abb. 3.59 sind das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie des Stamms KPKL81 in Abwesenheit von Zn^{2+} innerhalb eines Depletionsexperiments dargestellt. Bereits unter Kap. 3.9 (Abb. 3.54) wurde beschrieben, dass der Stamm KPKL91 aufgrund seiner geringeren Menge an GFP-PBP2_{x_{C405}} (Kap. 3.8.3) mit einer im Vergleich zu R6 langsameren Generationszeit von 52 min wächst und auch eine geringere Zelldichte erreicht. Morphologische Untersuchungen dieser Zellen zeigten bereits während der exponentiellen Wachstumsphase (Zeitpunkt 1) deutlich verlängerte und verformte Zellen. Zu Beginn der stationären Wachstumsphase waren die KPKL81 Zellen noch stärker verformt, was auf die Dezimierung des GFP-PBP2_{x_{C405}} zurückzuführen ist. Um die genaue Anzahl an Generationen bestimmen zu können, die der Stamm KPKL81 in Abwesenheit von ZnCl_2 wachsen kann, wurde

eine komplette Depletion des GFP-PBP2_xC₄₀₅ durchgeführt. Dafür wurde der Stamm KPKL81 nach dem Erreichen einer Zelldichte von 70 N in einer 1:20 Verdünnung erneut in C-Medium überführt. Die Zellen des Stamms KPKL81 waren in der Lage sich noch einmal zu verdoppeln. Somit konnte eine Anzahl von 6,5 Generationen als maximales Wachstum ermittelt werden. Danach setzte ein Wachstumsstopp ein (Abb. 3.59: Zeitpunkt 3), der sich durch sehr stark verformte Zellen kennzeichnete und es folgte eine rapide Lyse der Zellen (Abb. 3.59: Zeitpunkt 4 und 5).

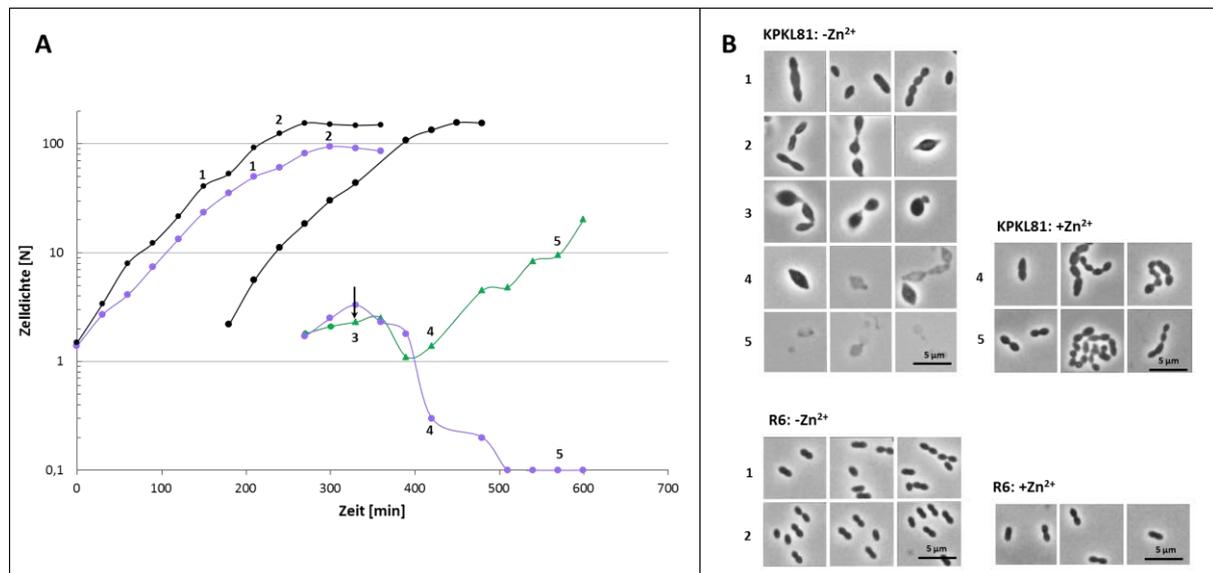


Abb. 3.59: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL81 in Abwesenheit von Zn²⁺. **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL81(P_{c_{zcd}}-gfp-pbp2_x C₄₀₅ Δpbp2_x) und dem Kontrollstamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne ZnCl₂ angeimpft. ●: R6, ●: KPKL81. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne ZnCl₂ überführt und beim Erreichen der stationären Phase mit ZnCl₂ (0,15 mM) induziert. ●: KPKL81 vor der Induktion, ▲: KPKL81: nach der Induktion, ●: ohne Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-5 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL81 im Vergleich zu R6. Pro Zeitpunkt (1-5) sind jeweils drei mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μm) ist angegeben.

Eine zweite Probe des Stamms KPKL81 wurde zum Zeitpunkt 3 mit 0,15 mM ZnCl₂ induziert. In der ersten Stunde nach der Induktion sank die Zelldichte der Probe zunächst auf 1 N ab. Circa 1,5 h nach der Induktion wurde ein leichter Anstieg der Zelldichte vermerkt. Die Morphologie der Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt (Abb. 3.59: Zeitpunkt 4) analysiert und es zeigten sich Zellen, die hauptsächlich in längeren Ketten vorlagen. Die einzelnen Zellen dieser Ketten besaßen jedoch keine einheitliche Größe. Bereits 4 h nach der Induktion konnte ein deutliches Wachstum der Zellen verzeichnet werden, das mit einer zunehmenden Erholung der Zellmorphologie einherging (Abb. 3.59: Zeitpunkt 5). Eine komplette Regeneration der Zellmorphologie konnte allerdings innerhalb dieser Zeit nicht beobachtet werden.

Es sollte weiterhin getestet werden, ob sich das Fehlen der Serinprotease HtrA und die damit im Vergleich zu KPKL71 erhöhte GFP-PBP2_{x_{C405}}-Menge in der Vorkultur von KPKL711 vorteilhaft auf das Wachstum und die Zellmorphologie auswirkt. Daher wurde das GFP-PBP2_{x_{C405}} in dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL711 durch eine komplette Depletion vollständig reduziert und die damit einhergehenden Veränderungen des Wachstums und der Zellmorphologie eingehend analysiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.

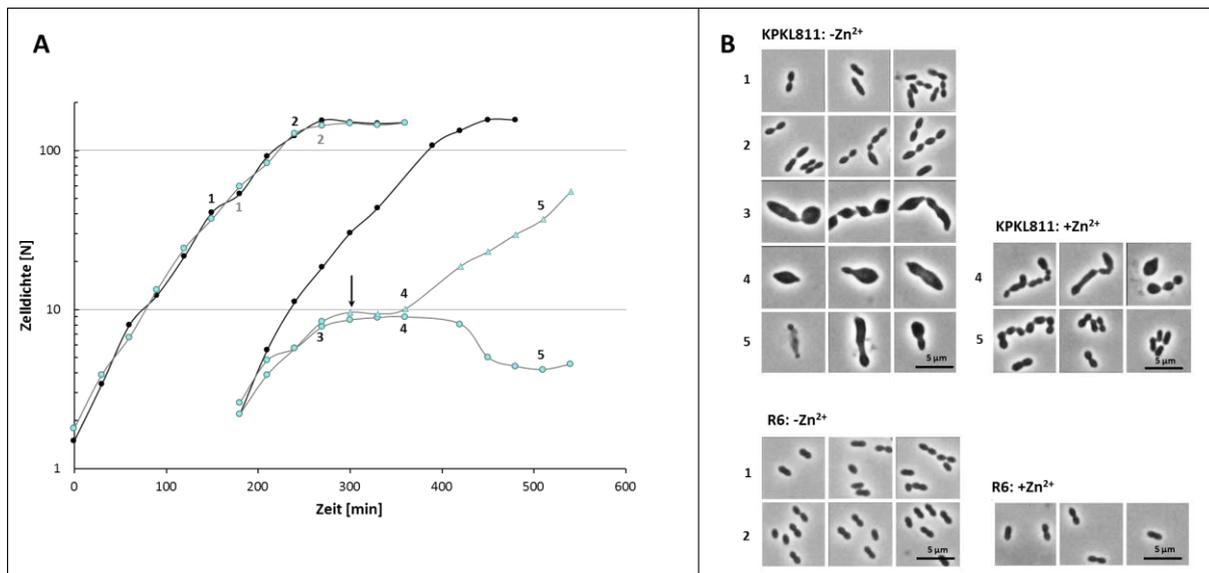


Abb. 3.60: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL811 in Abwesenheit von Zn²⁺. **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL811 (*P_{czcD}-gfp-pbp2_{x_{C405}} Δ_{bpb2x} Δ_{htrA}*) und dem Kontrollstamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit ZnCl₂ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne ZnCl₂ angeimpft. ●: R6, ●: KPKL811. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne ZnCl₂ überführt und beim Erreichen der stationären Phase mit ZnCl₂ (0,15 mM) induziert. ●: KPKL811 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: KPKL811 nach der Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-5 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL811 im Vergleich zu R6. Pro Zeitpunkt (1-5) sind jeweils drei mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μm) ist angegeben.

Anhand der Abb. 3.60 ist deutlich zu erkennen, dass der *htrA*-Deletionsstamm nachdem Auswaschen des ZnCl₂ und dem ersten Überimpfen in C-Medium genauso schnell wächst wie der Kontrollstamm R6 (43 min) und die gleiche maximale Zelldichte wie dieser erreicht. Die Zellen des *S. pneumoniae* KPKL811 Stamms lagen in Diplokokken und kurzen Ketten vor und waren in ihrer Zelllänge vergrößert (Zeitpunkt 1 und 2).

Sobald die Stämme R6 und KPKL811 eine Zelldichte von 70 N erreicht hatten, wurden sie erneut in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne zusätzliches ZnCl₂ überführt. Der Kontrollstamm R6 wuchs ohne Probleme direkt an, wohingegen der Stamm KPKL811 dazu in der Lage sich drei weitere Generationen zu verdoppeln ehe ein Wachstumsstopp eintrat. Zum Zeitpunkt 3, unmittelbar kurz vor

dem Wachstumsstopp der KPKL711 Zellen offenbart die morphologische Untersuchung stark deformierte, vergrößerte und aufgeblähte Zellen. In den folgenden 2,5 h befinden sich die Zellen des Stamms KPKL811 in einer stationären Phase, anschließend ist anhand der Wachstumskurve (Abb. 3.60 A) und der mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.60 B) eine deutliche Lyse der Zellen zu erkennen. Der Stamm KPKL811 ist demnach in der Lage 7,5 Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, wohingegen der Stamm KPKL81, der die Serinprotease HtrA beinhaltet 6,5 Generationen unter diesen Bedingungen wachsen kann.

Die beschriebenden Ergebnisse beweisen, dass die Deletion der Serinprotease HtrA sich sowohl in den Stamm KPKL711, als auch in KPKL811 positiv auf das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie auswirkt. Durch das Fehlen der Serinprotease HtrA wird in beiden Fällen das GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein durch diese nicht abgebaut. Da es im Vergleich zu KPKL71 und KPKL81 in erhöhter Menge in der Vorkultur vorliegt, dauert es länger bis sich die Depletion des GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein sowohl beim Wachstum, als auch bei der Zellmorphologie bemerkbar macht. Somit verformen sich die Zellen später und sterben langsamer.

Die dargestellten Depletionsexperimente der Stämme DKL031 (Abb. 3.55), KPKL81 (Abb. 3.59) und KPKL811 (Abb. 3.60) wurden innerhalb des gleichen Experiments untersucht um Schwankungen, die auf die Charge des C-Mediums zurückzuführen wären, auszuschließen. Anhand der Abb. 3.55 und Abb. 3.60 wird deutlich, dass die konditionalen Stämme DKL031 und KPKL811 in der Lage sind ebenso schnell wie R6 (Generationszeit: 43 min) zu wachsen und eine ebenso hohe Zelldichte zu erreichen. Der Stamm KPKL81 (Abb. 59), der ein konditionales GFP-PBP2_xC₄₀₅ beinhaltet, zeigt bereits nach dem ersten Überimpfen deutliche Wachstumsunterschiede, da er zum einen langsamer wächst und zum anderen eine geringere Zelldichte erreicht. Das GFP-PBP2_xC₄₀₅ beinhaltet die zwei AS-austausche L403F und T526S in PBP2_x, die das Fusionsprotein möglicherweise anfälliger für den Abbau durch die Serinprotease HtrA machen. Der Stamm KPKL81 ist in der Lage 6,5 Generationen ohne den Induktor zu wachsen, die KPKL81 Zellen deformieren sich und sterben am schnellsten von allen in diesem Experiment untersuchten Stämmen. Dem Stamm DKL031 (Abb. 3.55) ist es möglich sieben Generationen in Abwesenheit von ZnCl₂ zu wachsen und die Zellen dieses Stamms sterben demnach bei den Depletionsexperimenten etwas langsamer als die des Stamms KPKL81 (Abb. 3.59). Der *htrA*-Deletionsstamm (Abb. 3.60) ist in der Lage 7,5 Generationen ohne ZnCl₂ zu wachsen. Somit ist dieser Stamm durch die Deletion von HtrA dazu befähigt am längsten von allen hier untersuchten konditionalen Stämmen bei den Depletionsexperimenten zu überleben. Bemerkenswert ist dabei, dass die Deletion von HtrA diesem Stamm auch einen erkennbaren Wachstumsvorteil im Vergleich zu DKL031 verschafft, obwohl dieser das veränderte GFP-PBP2_xC₄₀₅ besitzt. Die Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten verifiziert, wobei aufgrund einer anderen Charge des C-Mediums die ermittelten Generationszeiten für die einzelnen Stämme leicht schwankten; die getroffenen Aussagen allerdings eindeutig bekräftigten.

3.9.3 Wirkt sich das Fehlen der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 auf das Wachstum und die Zellmorphologie innerhalb der Depletionsexperimente aus?

Anhand von Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern (Kap. 3.8.3; Abb. 3.51) wurde ein Abbau des Fusionsproteins GFP-PBP2x in dem Stamm DKL031 nachgewiesen, der auf die Serinprotease HtrA zurückgeführt werden konnte (Kap. 3.8.3). Die Deletion der Serinprotease HtrA in dem Stamm DKL031 (KPKL09) führte zu nachweislich reduzierten Abbauprodukten und einer leichten Veränderung in der Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins (Kap. 3.8.3).

Aufgrund dieser Feststellungen und der Tatsache, dass der *htrA*-Deletionsstamm KPKL811 bei den Depletionsexperimenten im Vergleich zu DKL031 deutlich länger überleben konnte, wird ein positiver Effekt auf die Zellmorphologie und das Wachstumsverhalten nach der Deletion der Serinprotease HtrA in dem Stamm DKL031 vermutet. Um dies zu belegen, wurden Depletionsexperimente mit dem *htrA*-Deletionsstamm KLKL09 durchgeführt. Als Kontrolle diente der Stamm *S. pneumoniae* R6. Damit ein direkter Vergleich hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Zellmorphologie gezogen werden konnte, wurde auch der konditionale Stamm DKL031, der die Serinprotease HtrA beinhaltet, innerhalb dieses Experiments auf die gleiche Weise analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind in vergleichender Form in der Abb. 3.61 zu sehen.

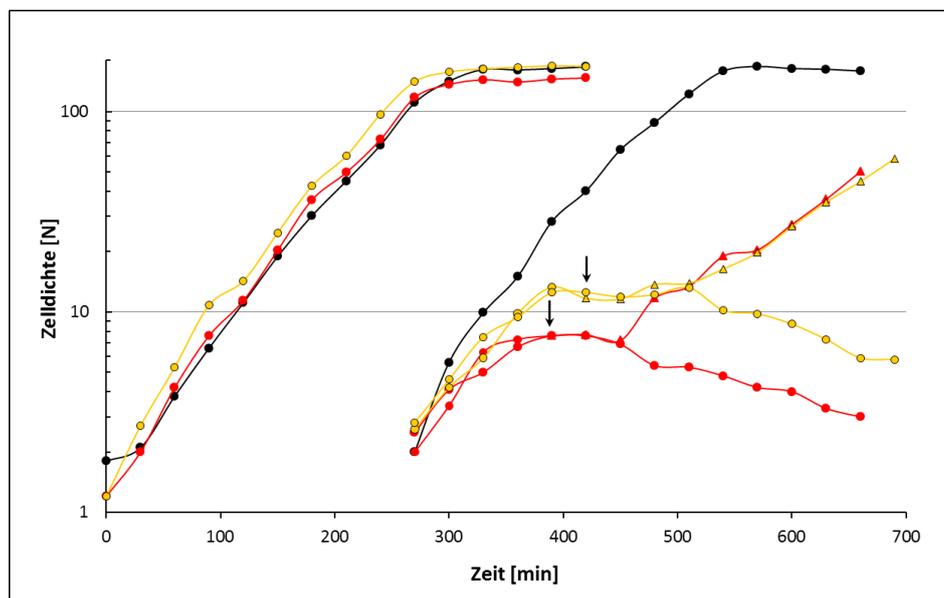


Abb. 3.61: Vergleich des Wachstums von *S. pneumoniae* DKL031 und KPKL09 in Abwesenheit von Zn^{2+} . Wachstumskurven von *S. pneumoniae* DKL031(R6, P_{czd} -*gfp-pbp2x* Δ *pbp2x*) und KPKL09 (DKL031, Δ *htrA*) und dem Stamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: R6, ●: DKL031, ●: KPKL09. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt. ●: DKL031 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: DKL031 nach der Induktion, ●: KPKL09 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: KPKL09 nach der Induktion. ↓: jeweiliger Zeitpunkt der Induktion.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stämme DKL031 und KPKL09 nach dem Auswaschen von ZnCl_2 und der ersten Überimpfung in C-Medium nahezu ebenso wachsen wie der Stamm R6. Auffällig ist dabei, dass der Stamm DKL031, im Gegensatz zu dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL09, eine im Vergleich zu R6 etwas verringerte maximale Zelldichte erreicht. Die Zellen des Stamm DKL031 waren in diesem Experiment, wie bereits zuvor beschrieben, in der Lage sieben Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, ehe ein Wachstumsstopp eintrat und die Zellen nach ca. 2 h in der stationären Phase zu lysieren begannen. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 besaß im Vergleich zu DKL031 einen eindeutigen Wachstumsvorteil, da ein Wachstumsstopp erst nach 8,5 Generationen Wachstum in Abwesenheit des Induktors eintrat. Auch bei diesem Stamm kam es nach ca. 2 h in der stationären Phase zu einer deutlich einsetzenden Lyse.

Neben dem Wachstum dieser Stämme innerhalb des Depletionsexperiments wurde auch die Morphologie dieser Zellen analysiert. Die detaillierten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Anhang in den Abbildungen 7.1 und 7.2 (Anhang) zu finden. Daraus wird ersichtlich, dass in dem Stamm KPKL09 die Deformierung der Morphologie der Zellen, die auf die Dezymierung des GFP-PBP2x-Fusionsprotein zurückzuführen ist, im Vergleich zu DKL031 deutlich später einsetzt. Dieses Ergebnis wurde in einem unabhängigen Depletionsexperiment bestätigt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Deformierung der KPKL09 Zellen um einen reversiblen Prozess handelt. Circa 2 h nach der Zugabe von ZnCl_2 (Abb. 3.61: Pfeil) setzte ein deutliches Wachstum der KPKL09 Zellen ein und die Zellmorphologie normalisierte sich zusehend, erreichte jedoch auch nach 4 h Stunden nach der Zugabe von ZnCl_2 noch keine vollständig normale Zellmorphologie.

Das interessante Ergebnis, dass im Stamm KPKL09 die Deformierung der Zellen und der damit einhergehende Wachstumsstopp im Vergleich zu DKL031 deutlich später einsetzt, bestätigt zusätzlich dass neben dem GFP-PBP2x_{C405} auch das GFP-PBP2x-Fusionsprotein durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird. Für den Stamm KPKL09 konnte eine im Vergleich zu DKL031 verringerte Menge an Abbauprodukten mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern nachgewiesen werden (Kap. 3.83; Abb. 3.51). Mit Hilfe der durchgeführten Depletionsexperimente konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Zellen des Stamms KPKL09 in der Vorkultur mit 0,15 mM ZnCl_2 , die für die Experimente verwendet wurde, im Vergleich zu den DKL03 Zellen, eine erhöhte Menge des Fusionsproteins GFP-PBP2x beinhalten, da dieses durch die Serinprotease HtrA nicht abgebaut wurde. Durch die erhöhte Menge an GFP-PBP2x in der Vorkultur des Stamms KPKL09 lässt sich das im Vergleich zu DKL031 langsamere Sterben der Zellen innerhalb des Depletionsexperiments erklären.

Der Unterschied in der Menge des Fusionsproteins GFP-PBP2x in den Stämmen KPKL09 und DKL031 unter induzierten Bedingungen konnte zuvor mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Da die Methode der Depletionsexperimente wesentlich sensibler ist, konnte dieser geringe Unterschied allerdings sichtbar gemacht werden.

Das Fusionsprotein GFP-PBP2x beinhaltet im Gegensatz zu GFP-PBP2x_{C405}, keine Veränderungen in PBP2x, die den Abbau durch die Serinprotease HtrA begünstigen könnten. Daher stellt sich die Frage, ob das Protein aufgrund der Fusion mit GFP möglicherweise anders gefaltet ist und dies den Abbau fördert. Oder ob das unveränderte PBP2x ein natürliches Target der Serinprotease HtrA ist; der regulierte Abbau allerdings in so geringer Menge stattfindet, dass dies zuvor nicht nachgewiesen werden konnte.

3.10 Lokalisationsstudien einzelner PBP2x-Domänen im Zusammenhang mit HtrA

Um zu untersuchen, ob die PASTA-Domänen des PBP2x, wie vermutet für die septale bzw. äquatoriale Lokalisation dieses essentiellen Proteins innerhalb der Zellteilung verantwortlich sind, wurde ein Satz N-terminaler GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte erstellt, in denen jeweils unterschiedliche Deletionen in PBP2x vorlagen. Die Lokalisation dieser GFP-PBP2x-Fusionskonstrukte wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (s. Kap. 1.2.2).

Das GFP-PBP2x-OP-Fusionskonstrukt war wie erwartet, aufgrund des Fehlens der PASTA-Domänen, nicht in der Lage sich innerhalb der Zelle korrekt zu lokalisieren; es wurden überwiegend komplett fluoreszierende Zellen nachgewiesen. Zudem wurde in einigen Zellen eine Akkumulation der Fluoreszenz in Form von verstreuten Punkten beobachtet (Schweizer, 2011).

Lokalisationsstudien der Stämme *S. pneumoniae* DKL15 (GFP-PBP2x-NP-Fusionsprotein) und DKL17 (GFP-PBP2x-OT-Fusionsprotein), die die zwei PASTA-Domänen besitzen, lieferten unerwartet Ergebnisse. In beiden Stämmen wurden hauptsächlich Zellen mit einem Fluoreszenzsignal, das über die komplette Zelle verteilt war, nachgewiesen. Nur in sehr seltenen Fällen wurde für das Fusionsprotein GFP-PBP2x-OT eine korrekte Lokalisation am Zellseptum beobachtet (Breckner, 2012). Mit Hilfe der Untersuchungen der Stämme DKL15 und DKL17 konnte die postulierte These, dass die PASTA-Domänen für die korrekte Lokalisation von PBP2x am Septum der Zellen verantwortlich sind, nicht bestätigt werden.

Anhand von Western-Blotanalysen mit α -PBP2x-Antikörpern wurde gezeigt, dass die Stämme *S. pneumoniae* DKL12 und DKL17 unter Zn^{2+} -induzierten Bedingungen dazu fähig waren die Fusionsproteine GFP-PBP2x-OP (97,6 kDa) bzw. GFP-PBP2x-OT (72,3 kDa) in geringeren Mengen zu synthetisieren (Schweizer, 2011; Breckner, 2012). In beiden Stämmen wurde innerhalb dieser Experimente ein Abbauprodukt mit einer Größe von ca. 50 kDa detektiert. In dem Stamm *S. pneumoniae* DKL15 konnte die Synthese des Fusionsproteins GFP-PBP2x-NP, das eine erwartete Größe von 49,2 kDa besitzt, mit Hilfe von Western-Blotanalysen mit α -PBP2x-Antikörpern nicht nachgewiesen werden (Breckner, 2012).

Im Folgenden wurde zum einen überprüft, ob die detektierten, zytoplasmatisch leuchtenden Fluoreszenzsignale in den Stämmen DKL12, DKL15 und DKL17 auf Abbauprodukte zurückgeführt werden können, die GFP enthalten und im Zytoplasma vorliegen. Zum anderen wurde untersucht, ob die Synthese des GFP-PBP2x-NP-Fusionsproteins mit Hilfe von α -GFP-Antikörpern nachgewiesen werden

kann. Dafür wurden Zellysate der Stämme DKL12, DKL17 und DKL15 mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern getestet. Als Kontrollen dienten Zellysate der Stämme *S. pneumoniae* R6, DKL03 und DKL031. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.62 dargestellt.

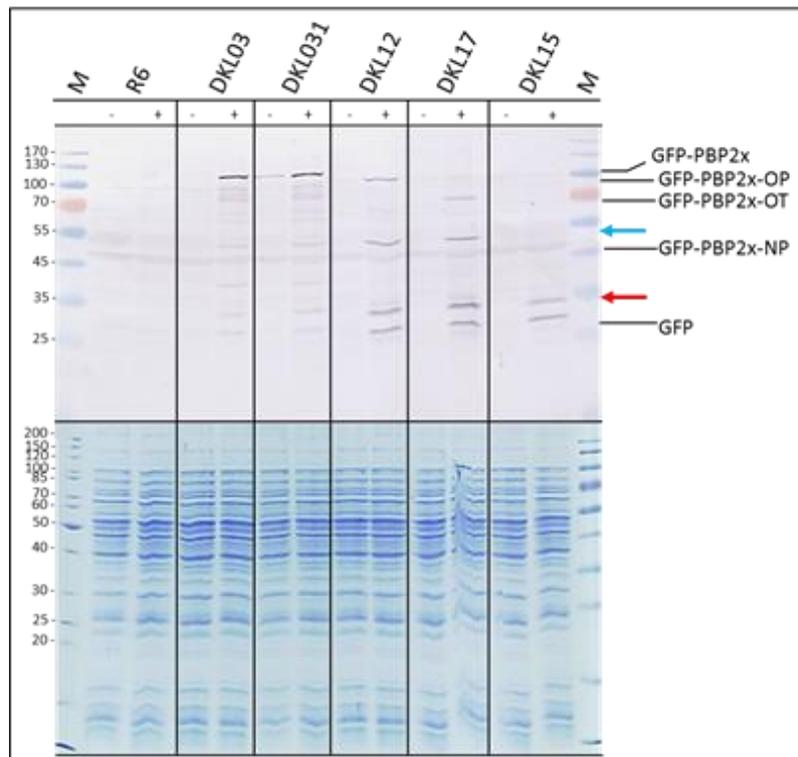


Abb. 3.62: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von diversen GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zellysaten genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegefärbtes der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL03 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*), DKL031 (DKL03 Δ *pbp2x*), DKL12 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*OP, Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750), DKL17 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*OT, interne Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616), DKL15 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x*NP, interne Deletion in PBP2x von AS T56 bis D616). Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 3 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, +: Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM $ZnCl_2$ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Ein weiteres 12,5 %ige SDS-Gel wurde mit 10 μ l der gleichen Zellysate ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen, 1:2.000) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab, oben). Die Lagen der verschiedenen detektierten GFP-PBP2x-Fusionsproteine (GFP-PBP2x: 110,6 kDa, GFP-PBP2x-OP: 97,6 kDa, GFP-PBP2x-OT: 72,3 kDa, GFP-PBP2x-NP: 49,2 kDa) sind angezeigt. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2x-NP (49,2 kDa) in dem Stamm DKL15 mit Hilfe der α -GFP-Antikörpern nur sehr schwach detektiert werden kann. Weiterhin weist das Zellysate des Stamms DKL15 zwei Abbauprodukte auf (GFP: 26 kDa, roter Pfeil: ca. 35 kDa). Dies spricht dafür, dass dieses Fusionsprotein entweder nicht richtig synthetisiert wird oder aufgrund seiner Instabilität nach der Synthese direkt wieder abgebaut wird. Das wiederum würde die Abbauprodukte und das daraus resultierende, beobachtete Fluoreszenzsignal, das innerhalb der kompletten Zelle nachgewiesen werden konnte, erklären.

Weiterhin ist zu sehen, dass die Fusionskonstrukte GFP-PBP2_x-OP (97,6 kDa) und GFP-PBP2_x-OT (72,3 kDa) in den Zelllysaten der Stämme DKL12 bzw. DKL17, die zuvor mit 0,15 mM ZnCl₂ induziert wurden, nachgewiesen werden konnten. Die detektierten Mengen dieser Fusionsproteine sind allerdings im Vergleich zu dem nachgewiesenen GFP-PBP2_x-Fusionsproteinen in den Stämmen DKL03 und DKL031 deutlich geringer. Gleichzeitig zeigt sich in den Zelllysaten der Stämme DKL12 und DKL17 ein sehr ähnliches Muster an Abbauprodukten. In beiden Stämmen wurden im Vergleich zu DKL03 und DKL031 wesentlich höhere Mengen der Abbauprodukte bei ca. 26 kDa (GFP), bei ca. 35 kDa (roter Pfeil) und bei ca. 50 kDa (hellblauer Pfeil) detektiert. Im Zelllysat des Stamms DKL12 kann zusätzlich eine schwächere Abbaubande bei ca. 60 kDa nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Fusionsproteine GFP-PBP2_x-OT und GFP-PBP2_x-OP stärker abgebaut werden. Die detektierten Fluoreszenzsignale in diesen Stämmen sind offenbar auf das kleinste fluoreszierenden Abbauprodukte, das der Größe von GFP entspricht und das im Zytoplasma vorliegt, zurückzuführen. Dadurch könnte das eigentliche Fluoreszenzsignal verdeckt werden.

In den zuvor analysierten Stämmen KPKL81 und KPKL71 wurde mit Hilfe von Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern ein nahezu identisches Muster an Abbauprodukten wie in DKL12 und DKL17 detektiert (Kap. 3.8.3). Zusätzlich wurde in den Stamm KPKL71, ähnlich wie in DKL12, DKL15 und DKL17, hauptsächlich ganzheitlich leuchtende Zellen nachgewiesen. Dieses Fluoreszenzsignal wurde auf die detektierten Abbauprodukte, die GFP enthalten und im Zytoplasma vorliegen, zurückgeführt. Sobald die Serinprotease HtrA in diesen Stamm deletiert wurde, lagen die Fusionsproteine in erhöhter Menge vor, die Menge der Abbauprodukte wurde reduziert und die eigentliche Lokalisation des GFP-PBP2_xC405-Fusionsproteins wurde sichtbar.

Um zu überprüfen ob dies ebenfalls für die jeweiligen GFP-PBP2_x-Fusionsproteine der Stämme DKL12, DKL15 und DKL17 zutrifft, wurde das Gen *htrA* in diesen Stämmen deletiert und die Zelllysate mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern untersucht. Als direkte Kontrollen möglicher Proteinmengenunterschiede wurden die Zelllysate der Parentalstämmen und des Stamms DKL031 ebenfalls aufgetragen. Die Ergebnisse sind der Abb. 3.63 zu entnehmen. Der *htrA*-Deletionsstamm DKL151 weist ebenso wie sein Parentalstamm nur sehr wenig GFP-PBP2_x-NP-Fusionsprotein auf; es können weiterhin zwei Abbauprodukte (GFP: ca 26 kDa; roter Pfeil: ca. 35 kDa) detektiert werden. Demnach wird das GFP-PBP2_x-NP-Fusionsprotein und DKL15 und DKL151 nur in sehr geringen Mengen synthetisiert und die beiden detektierten Abbauprodukte sind nicht auf HtrA zurückzuführen.

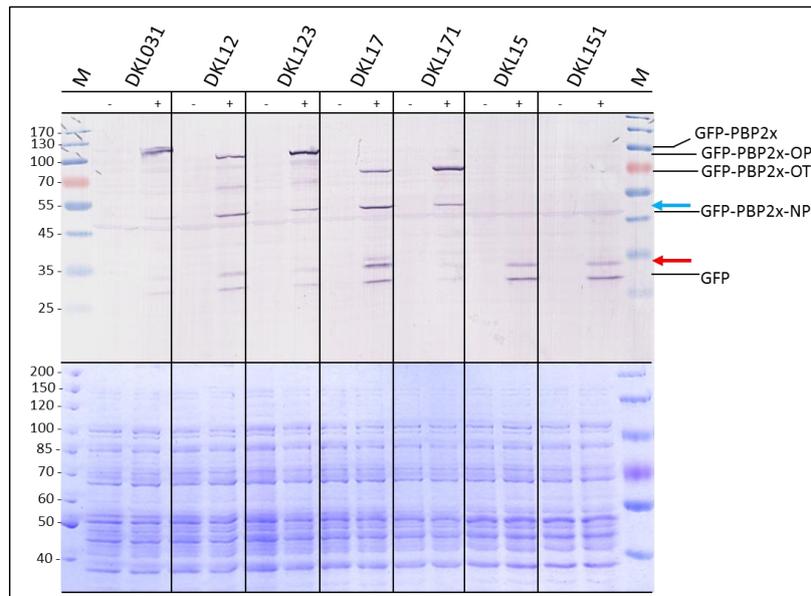


Abb. 3.63: Western-Blotanalyse mit α -GFP-Antikörpern zur Detektion von GFP-PBP2x-Fusionsproteinen in Zelllysaten der Stämme DKL031, DKL12, DKL123, DKL17, DKL171, DKL15 und DKL151. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalyse und des Coomassiegefärbtes der Zelllysate bei einer Zelldichte von N_{70} . Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL031 (DKL03 $\Delta pbp2x$), DKL12 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2xOP*, Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750), DKL123 (DKL12 $\Delta htrA$), DKL17 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2xOT*, interne Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616), DKL171 (DKL17 $\Delta htrA$), DKL15 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2xNP*, Deletion in PBP2x von AS T56 bis D616), DKL151 (DKL15 $\Delta htrA$). Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 3 μ l der hergestellten Zelllysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, + : Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM $ZnCl_2$ gewachsenen Kultur. Nach einer Auftrennung durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE wurde zunächst eine Coomassiefärbung durchgeführt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab, unten). Ein weiteres 12,5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μ l der gleichen Zelllysate ebenso beladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferriert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen, 1:2.000) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab, oben). Die Lagen der verschiedenen detektierten GFP-PBP2x-Fusionsproteine (GFP-PBP2x: 110,6 kDa, GFP-PBP2x-OP: 97,6 kDa, GFP-PBP2x-OT: 72,3 kDa, GFP-PBP2x-NP: 49,2 kDa) sind angezeigt. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine.

Dagegen kann im *htrA*-Deletionsstamm DKL123 eine im Vergleich zu DKL12 deutlich erhöhte Menge des GFP-PBP2x-OP-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Zusätzlich nimmt die Menge dreier detektierter Abbauprodukte in DKL123 deutlich ab (GFP: ca. 26 kDa, roter Pfeil: ca. 35 kDa und hellblauer Pfeil: ca. 50 kDa). Allerdings bleibt die Menge des Abbauprodukts bei ca. 60 kDa in beiden Stämmen unverändert. Die Deletion der Serinprotease HtrA wirkt sich auch auf das GFP-PBP2x-OT-Fusionsprotein positiv aus. In dem *htrA*-Deletionsstamm DKL171 wurde im Vergleich zu DKL17 eine eindeutig gesteigerte Menge des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins detektiert. Korrelierend dazu sank die nachgewiesene Menge an den drei Abbauprodukten (GFP: ca. 26 kDa; roter Pfeil: ca. 35 kDa) in dem Stamm DKL171.

Eine mögliche positive Auswirkung der erhöhten Menge der GFP-PBP2x-OP- bzw. GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteine und der deutlich reduzierten Mengen der Abbauprodukte in den *htrA*-Deletionsstämmen DKL123 und DKL171 auf die Lokalisation wurde untersucht.

Hierfür wurden die Stämme DKL12, DKL123, DKL17 und DKL171 wie unter Kap. 2.6.4.2 beschrieben vorbereitet. Zellen die eine Zelldichte von 120 N erreicht hatten, wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die erhaltenen Fluoreszenzsignale verglichen. Ein repräsentatives Beispiel des Ergebnisses der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellen der Stämme *S. pneumoniae* DKL12 (A) und DKL123 (B) sind in Abb. 3.64 zu finden.

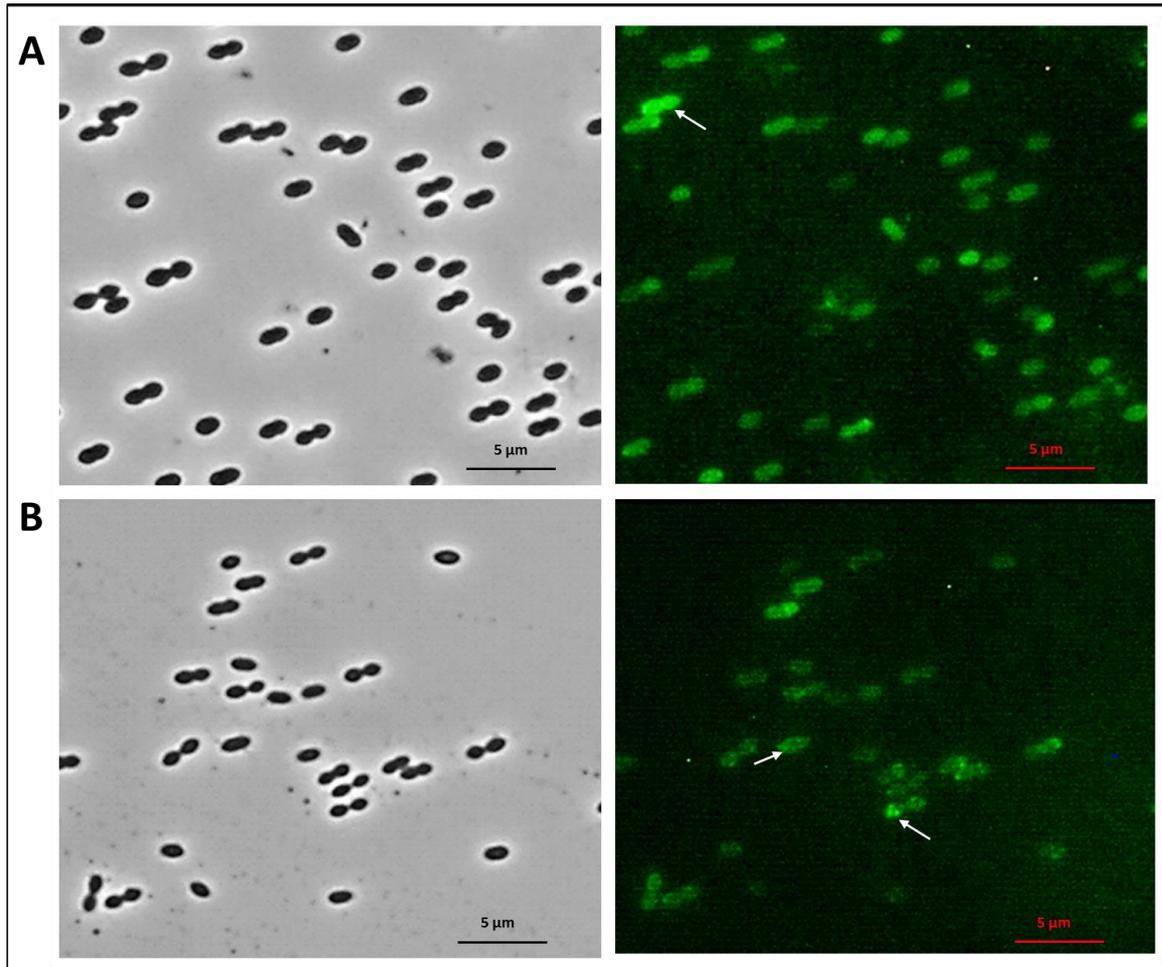


Abb. 3.64: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme *S. pneumoniae* DKL12 und DKL123. **A:** Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen von DKL12 (R6, P_{ccdB} -*gfp-pbp2xOP*, Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750) sind oben abgebildet. **B:** Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen von DKL12 (*DKL12 ΔhtrA*) sind unten abgebildet. Links sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen zusehen und die Fluoreszenzaufnahmen sind auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist jeweils unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Anhand der Abb. 3.64 A ist die bereits beschriebene Lokalisation des GFP-PBP2x-OP-Fusionsproteins (Schweizer, 2011) in den Zellen des Stamms DKL12 zu sehen. Es zeigt sich ein diffuses Fluoreszenzsignal, das über die komplette Zelle verstreut ist. Im direkten Vergleich ist in Abb. 3.64 B eine eindeutig veränderte Lokalisation des GFP-PBP2x-OP-Fusionsproteins in den Zellen des

htrA-Deletionsstamms DKL123 zu erkennen. Das zuvor in DKL12 beobachtete diffuse Fluoreszenzsignal, das zu einem ganzheitlichen Leuchten der Zellen führt, ist in dem Stamm DKL123 in abgeschwächter Form zu sehen. Das GFP-PBP2x-OP-Fusionsprotein zeigt stattdessen eine deutlich zu erkennende Akkumulation der Fluoreszenz in Form von Punkten. Diese sind über die Zelle verstreut, jedoch nie am Zellseptum selbst, zu finden sind. Dieses Phänomen wurde bereits für einige wenige DKL12 Zellen beschrieben und mit der Verankerung des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins an der Membran an diesen Stellen begründet (Schweizer, 2011).

Die Deletion von HtrA verringert die Menge an fluoreszierenden zytoplasmatisch vorliegenden Abbauprodukten und erhöht die Menge an GFP-PBP2x-OP, wodurch sich tatsächlich das detektierte Fluoreszenzsignal dieses Fusionsproteins ändert. Die bisher getroffene Aussage, dass die PASTA-Domänen des PBP2x für die korrekte Lokalisation verantwortlich sind, wird dadurch zusätzlich bestätigt, da das deutlich zu erkennende Fluoreszenzsignal des GFP-PBP2x-OP in dem *htrA*-Deletionsstamm DKL123 auch nicht am Zellseptum lokalisiert ist. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass interessanterweise die Deletion von *htrA* zu einer Veränderung in der Zellmorphologie führt, da die DKL123 Zellen im Vergleich zu DKL12 Zellen deutlich kleiner sind. Diese Ergebnisse wurden in einem unabhängigen Experiment verifiziert.

In Abb. 3.65 A ist ein typisches Beispiel der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellen des Stamms DKL17 und in Abb. 3.65 B im direkten Vergleich dazu eine des *htrA*-Deletionsstamms DKL171 zu sehen. Anhand der fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme in Abb. 3.65 A wird die bereits beschriebene Lokalisation des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins in dem Stamm DKL17 bestätigt. Die untersuchten Zellen zeichnen sich durch das Leuchten der ganzen Zelle aus. In einem geringen Anteil der Zellen fand sich eine korrekte Lokalisation des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins am Zellseptum (angezeigt durch einen weißen Pfeil in Abb. 3.65 A).

In den Zellen des *htrA*-Deletionsstamms DKL171 konnte dagegen ein komplett anderes Fluoreszenzmerkmal des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Aufgrund des Fehlens der Serinprotease HtrA wurde das Fusionsprotein GFP-PBP2x-OT-Protein durch diese nicht abgebaut und lag in deutlich erhöhter Menge vor. Zusätzlich gab es eindeutig weniger Abbauprodukte in diesem Stamm. Daher wurde die eigentliche Lokalisationsstelle des GFP-PBP2x-OT-Fusionsprotein in der Zelle sichtbar. Es zeigte sich eine eindeutige korrekte septale Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins. Diese Experimente erbrachten den endgültigen Beweis, dass das PBP2x anhand seiner PASTA-Domänen seine septale Position innerhalb der Zelle findet.

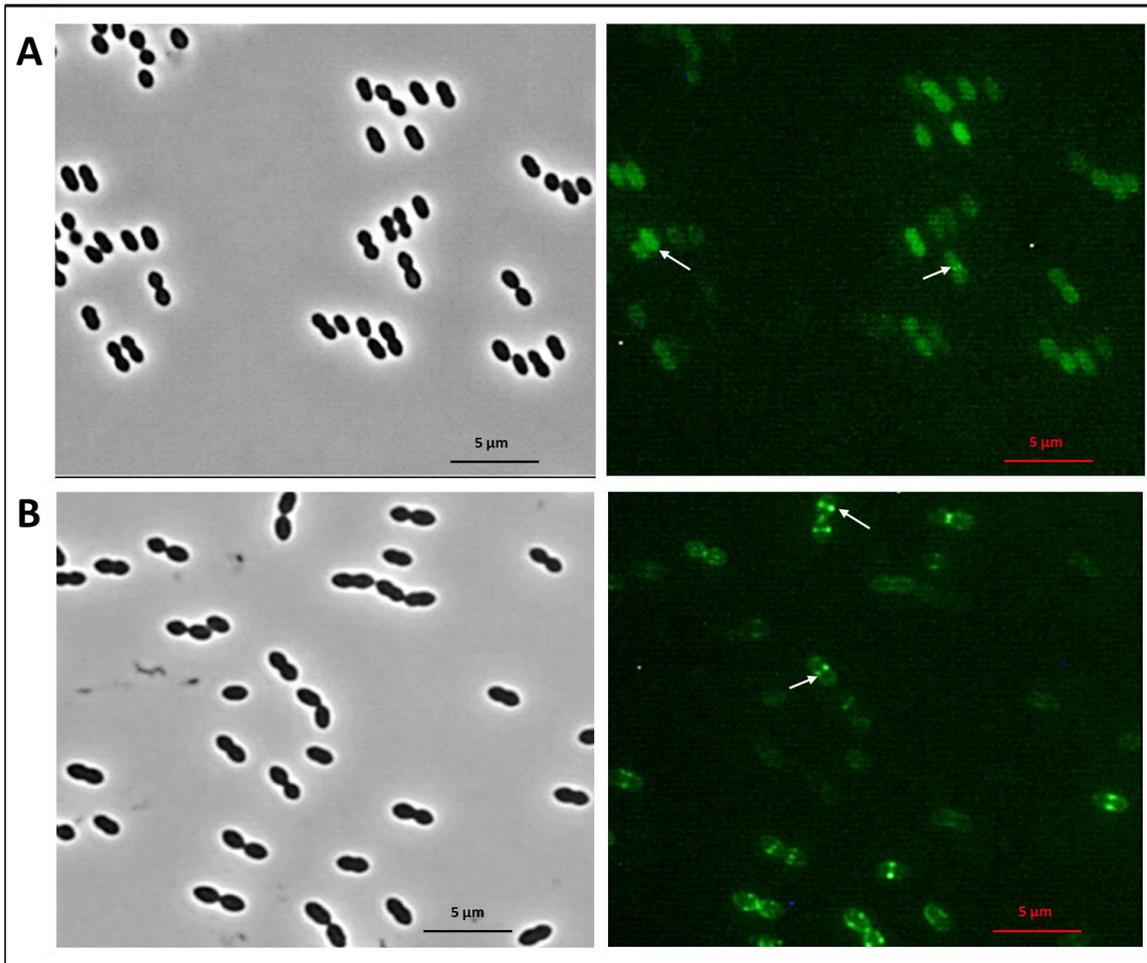


Abb. 3.65: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme *S. pneumoniae* DKL17 und DKL171.
A: Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen von DKL17 (R6, $P_{cxd-gfp-pbp2xOT}$ (Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616) sind oben abgebildet. **B:** Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen von DKL171 (DKL17 $\Delta htrA$) sind unten abgebildet. Links sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen zusehen und die Fluoreszenzaufnahmen sind auf der rechten Seite abgebildet. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Der Maßstab ist jeweils unten rechts im Bild zu finden. Weiße Pfeile kennzeichnen Zellen, bei denen die Lokalisation des Fusionsproteins gut zu erkennen ist.

Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL17 und DKL171

Um die ermittelten Ergebnisse der Lokalisationsstudien der Stämme *S. pneumoniae* DKL17 und DKL171 objektiv auswerten zu können, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Hierfür wurde verfahren wie bereits unter Kap. 2.6.4.2 beschrieben. In der aufgestellten Statistik wurden ausschließlich fluoreszierende Zellen berücksichtigt. Für den Stamm *S. pneumoniae* DKL17 wurden für die Anfertigung der Statistik insgesamt 667 und für DKL171 insgesamt 454 fluoreszierende Zellen ausgewertet. In der Abb. 3.66 ist der Vergleich der statistischen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Lokalisation des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins in den Stämmen *S. pneumoniae* DKL17 und DKL171 zu finden.

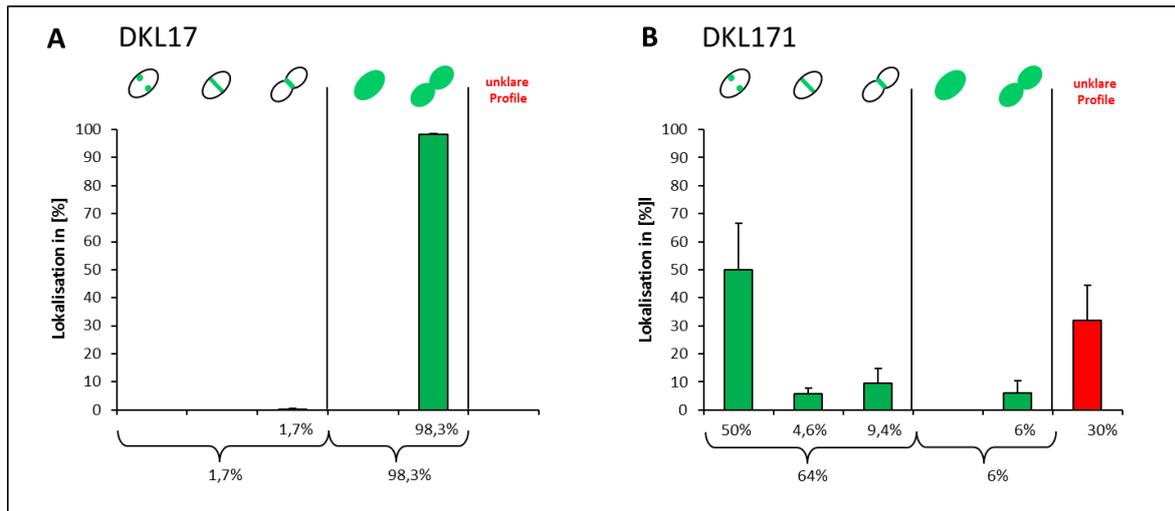


Abb. 3.66: Statistische Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL17 und DKL171. Dargestellt sind die statistischen Auswertungen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Stämme *S. pneumoniae* DKL17 (R6, $P_{czd-gfp-pbp2xOT}$ (interne Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616) (A) und DKL171 (DKL17 $\Delta htrA$) (B) im Vergleich. Für jede statistische Auswertung wurden jeweils drei mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen, die aus zwei unabhängigen Experimenten stammen, ausgezählt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Stämme zuvor in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 120 angezogen. Nicht fluoreszierende Zellen wurden in den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ermittelten Lokalisation des jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionsproteins sind als grüne Balken dargestellt und in [%] angegeben. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die Mittelwerte der unklaren Profile sind als rote Balken dargestellt und in [%] angegeben. Septale bzw. äquatoriale Lokalisation des Fusionsproteins: : kokkale Zelle; Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins erscheint an zwei Stellen. : kokkale Form; Fluoreszenzsignal zeigt sich als Linie in der Zellmitte. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle ist zu erkennen; Fluoreszenzsignal wird am Septum detektiert. Zytoplasmatisch leuchtende Zellen: : kokkale Form. : Zellteilung ist fortgeschritten; deutliche Einschnürung der Zelle am Septum

Das Fluoreszenzsignal des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins in dem Stamm DKL17 wurde bei nur 1,7 % der Zellen am Zellseptum beobachtet: Die restlichen 98,3 % der untersuchten Zellen leuchteten komplett. Die Auswirkung der Deletion von HtrA ist anhand der in Abb. 3.66 B dargestellten Statistik zweifelsfrei zu sehen. In dem *htrA*-Deletionsstamm DKL171 wiesen 64 % der Zellen eine Lokalisation des GFP-PBP2x-OT-Fusionsproteins an den Zellteilungszonen auf und nur in einem geringen Anteil von 6 % wurden ganzheitlich leuchtende Zellen nachgewiesen. Bei 30 % der analysierten DKL171 Zellen konnte das Fluoreszenzsignal nicht eindeutig zugeordnet werden (unklare Profile).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PASTA-Domänen des PBP2x für eine korrekte septale bzw. äquatoriale Lokalisation dieses essentiellen Enzyms am Zellseptum verantwortlich sind. Dies konnte mit Hilfe der Fusionskonstrukte GFP-PBP2x-OP und GFP-PBP2x-OT in den *htrA*-Deletionsstämmen DKL123 bzw. DKL171 eindrucksvoll bewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Serinprotease HtrA in der Lage ist die GFP-PBP2x-OT- und GFP-PBP2x-OP-Fusionsproteine abzubauen, wobei ein annähernd identisches Muster an Abbauproteinen mit Hilfe von α -GFP-Antikörpern nachgewiesen werden konnte, wie zuvor bei dem Abbau der GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsproteine in KPKL81 und KPKL71. Dies lässt vermuten, dass die Serinprotease HtrA in der Lage ist mehrere Stellen innerhalb der verschiedenen untersuchten GFP-PBP2x-Fusionsproteine spezifisch zuerkennen und an diesen eine proteolytische Spaltung durchzuführen.

3.11 Überexpression der Serinprotease HtrA

Die Überexpression der Serinprotease HtrA war für die Herstellung von Antikörpern gegen dieses Protein nötig. Zur Durchführung von Interaktionsstudien wurde neben einer proteolytisch inaktiven Form von HtrA, auch eine Form mit einer funktionellen Proteaseaktivität benötigt.

3.11.1 Überexpression des proteolytisch inaktiven Form von HtrA

Neben DegP aus *E. coli* wurde auch für andere Proteasen der HtrA-Familie eine autokatalytische Funktion beschrieben, die zum Selbstabbau führt (Skórko-Glonek *et al.*, 2003). Weiterhin wurden zwei Cysteinreste (Cys⁵⁷ und Cys⁶⁹) und eine Disulfidbrücke in DegP für die Stabilität dieses Proteins gegen Autoprteolyse als wichtig erwiesen (Skórko-Glonek *et al.*, 2003). Weil beides dem HtrA aus *S. pneumoniae* fehlt, wird ein verstärkter automatischer Abbau dieses Proteins vermutet (Cassone *et al.*, 2012).

Da sich dies bei der Überexpression als problematisch erweisen kann, wurde die Proteasefunktion durch die Einführung der Mutation S234A im katalytischen Zentrum von HtrA inaktiviert. Mit Hilfe des Plasmids pKP03 (Tab. 2.4) wurden sowohl in *E. coli* BL21 (DE3) pLys S, als auch in *E. coli* JM109 (Tab. 2.3) Transformanten erstellt, bei denen das komplette *htrA*_{S234A} N-terminal an einen GST-Tag fusioniert war. Anschließend erfolgte eine Überexpression und Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose (Kap. 2.9.5.1). Das überexprimierte Protein GST-HtrA_{S234A} war bei allen durchgeführten Versuchen jedoch unlöslich und befand sich in großen Mengen in der Pelletfraktion (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde zur Überexpression des Protease-inaktivem HtrAs in voller Länge (AS 1 bis 393) eine Fusion an einem N-terminal His₆-Tag, das Plasmid pKP04 (Tab. 2.4) erstellt. Dieses wurde in kompetente *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tab. 2.3) Zellen transformiert. Nach einer Überprüfung der Transformanten wurde in beiden Fällen die Überexpression von His₆-HtrA_{S234A} mittels Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt (Kap. 2.9.5.2). Die Synthese des Proteins His₆-

HtrA_{S234A} konnte zwar erfolgreich nachgewiesen werden; jedoch gelang die Aufreinigung dieses Proteins trotz der Verwendung zahlreicher verschiedener Elutionspuffer nicht (Daten nicht gezeigt). Anstelle des Proteins His₆-HtrA_{S234A} (ca. 43 kDa), konnten nur zahlreiche Nebenprodukte mit unterschiedlicher Größe eluiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um eine Überexpression der Serinprotease dennoch zu realisieren, wurde daraufhin versucht das Protein HtrA_{S234A}oTM (Protease-Aktivität inaktiviert, AS 2-30 deletiert), das N-Terminal an ein His₆ Tag fusionierte war, überzuexprimieren. Diesem Protein fehlt die hydrophobe Region am N-Terminus von HtrA, die laut Sebert (Sebert *et al.*, 2005) membranassoziiert ist. Die Region wird entweder als sogenanntes Signalpeptid (Cassone *et al.*, 2012) oder als Transmembranregion definiert (Clausen *et al.*, 2002). Durch das Fehlen dieser Region in dem Protein wurden eine gute Löslichkeit des Proteins und damit eine Überexpression mit anschließender problemloser Aufreinigung erwartet.

Das Plasmid pKP041 (Tab. 2.4) wurde in kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen (Tab. 2.3) transformiert. Nach der Überprüfung der Transformanten mittels Kultur-PCR und Sequenzierung wurde das Protein His₆-HtrA_{S234A} anhand einer Nickel-Affinitätschromatographie (Kap. 2.9.5.2) aufgereinigt. In Abb. 3.67 ist das Ergebnis der Überexpression von His₆-HtrA_{S234A}oTM mit anschließender Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie dargestellt.

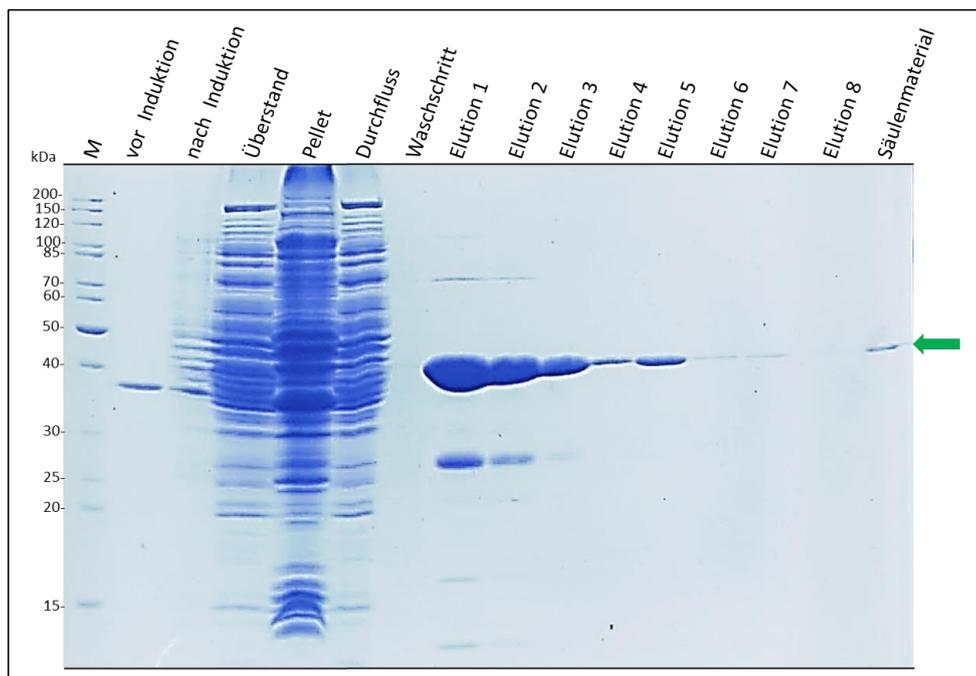


Abb. 3.67: Proteinsynthese der proteolytisch inaktiven Form von HtrA im Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist das Ergebnis der Überexpression von His₆-HtrA_{S234A}oTM mit anschließender Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Das Gel zeigt Proben vor und nach der Induktion mit 1 mM IPTG, sowie des Überstandes und des Pellets nach der Behandlung der Zellen mit Ultraschall. Während der Nickel-Affinitätschromatographie wurden Proben des Durchflusses, des Waschschrifts, der acht Elutionsfraktionen und des Säulenmaterials entnommen und ebenfalls aufgetragen. Jeweils 10 µl pro Proben wurden aufgetragen und mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteins ist durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet (ca. 39 kDa).

Anhand des in Abb. 3.67 dargestellten SDS-Gels sind bei der Probe, die nach der Induktion entnommen wurde, mehrere Proteinbanden vorhanden, die in der Probe vor der Induktion nicht zu sehen sind. Darunter befindet sich auch eine Proteinbande bei ca. 40 kDa, die der Größe des Proteins His₆-HtrA_{S234A}oTM (39,6 kDa) entspricht. Dies beweist die erfolgreiche Induktion der Proteinsynthese nach Zugabe von IPTG. Möglicherweise ist auch etwas von der Probe der Überstandfraktion in die benachbarte übergelaufen. Das lösliche Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM liegt in der Überstands- und auch in der Durchflussfraktion vor und konnte in den Elutionen 1-3 in sehr großen Mengen eluiert werden. Zusätzlich zu der His₆-HtrA_{S234A}oTM-Bande bei ca. 40 kDa ist eine weitere Nebenbande bei 25 kDa deutlich zu sehen. Zwei weitere schwächere Nebenprodukte zeigen sich bei ca. 70 kDa und bei ca. 100 kDa. Eine weitere Bande befindet sich oberhalb der 15 kDa Markerbande und eine andere unterhalb dieser; beide sind schwach zu sehen. In den Elutionsfraktionen 4-7 kann das Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen werden, als in den drei ersten Elutionen. In der Probe des Säulenmaterials ist ebenfalls das Protein bei ca. 40 kDa zu sehen, was dafür spricht, dass sich an der Säule noch His₆-HtrA_{S234A}oTM-Protein befand, das nicht eluiert werden konnte. Es erfolgte eine Umpufferung der isolierten Fusionsproteine in 20 mM Natriumphosphatpuffer, der für die anschließende Herstellung der Antikörper gegen HtrA (Kap. 2.9.6) geeignet ist. Die Abb. 3.68 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis.

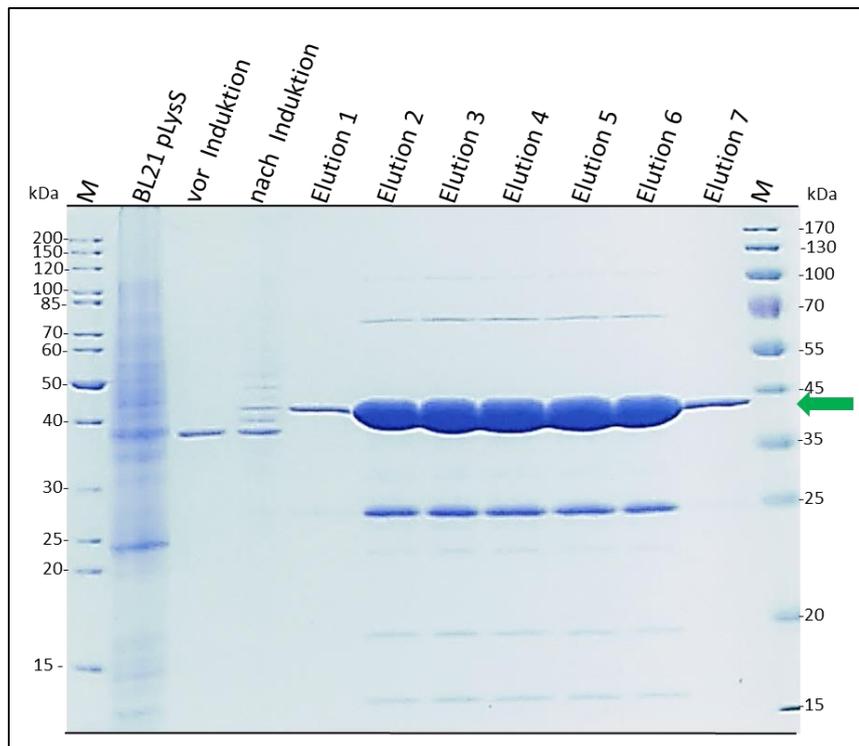


Abb. 3.68: Umpufferung und Entsalzung der proteolytisch inaktiven Form von HtrA. Dargestellt sind jeweils sieben Elutionsfraktionen nach der Umpufferung des His₆-HtrA_{S234A}oTM-Fusionsproteins mittels PD-10 Säule. Zur Kontrolle sind die Proben vor und nach der Induktion ebenfalls gezeigt. Jeweils 10 µl pro Probe wurden aufgetragen und mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteins ist durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet (ca. 39 kDa).

Das überexprimierte His₆-HtrA_{S234A}oTM-Protein ist bei ca. 40 kDa in den Elutionsfraktionen 2-6 in sehr großen Mengen zu sehen. Zusätzlich zeigen sich wie bereits beschrieben, schwächere Nebenbanden. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Nanodrop und mittels Bradford-Assay bestimmt und die Proben zur Antikörperherstellung an die Firma SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen verschickt (Kap. 2.9.6). Für die *in vitro*-Studien (Kap. 3.12) wurde HtrA_{S234A}oTM in einem unabhängigen Experiment erneut überexprimiert, aufgereinigt und umgepuffert (Daten nicht gezeigt).

3.11.1.1 Überprüfung der Antikörper α -HtrA 12003 und 12004

Die durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories hergestellten Antiseren gegen die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* wurden getestet. Dafür wurden das jeweilige Prä-Immunsereum, die erste, zweite und die finale Blutung der beiden Antikörper 12004 (2-Monatsprotokoll) und 12003 (3-Monatsprotokoll) auf ihre Spezifität hin, wie unter Kap. 2.9.6 erläutert, überprüft. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten eine deutliche Zunahme der Spezifität beider Antikörper mit jeder getesteten Blutung, da Proteine, die als Negativkontrolle dienten, im Gegensatz zu dem HtrA_{S234A}oTM-Protein, zunehmend nicht erkannt wurden (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.69 ist beispielhaft der Test der finalen Blutung des Antikörpers α -HtrA 12003 (diese Arbeit) zu sehen.

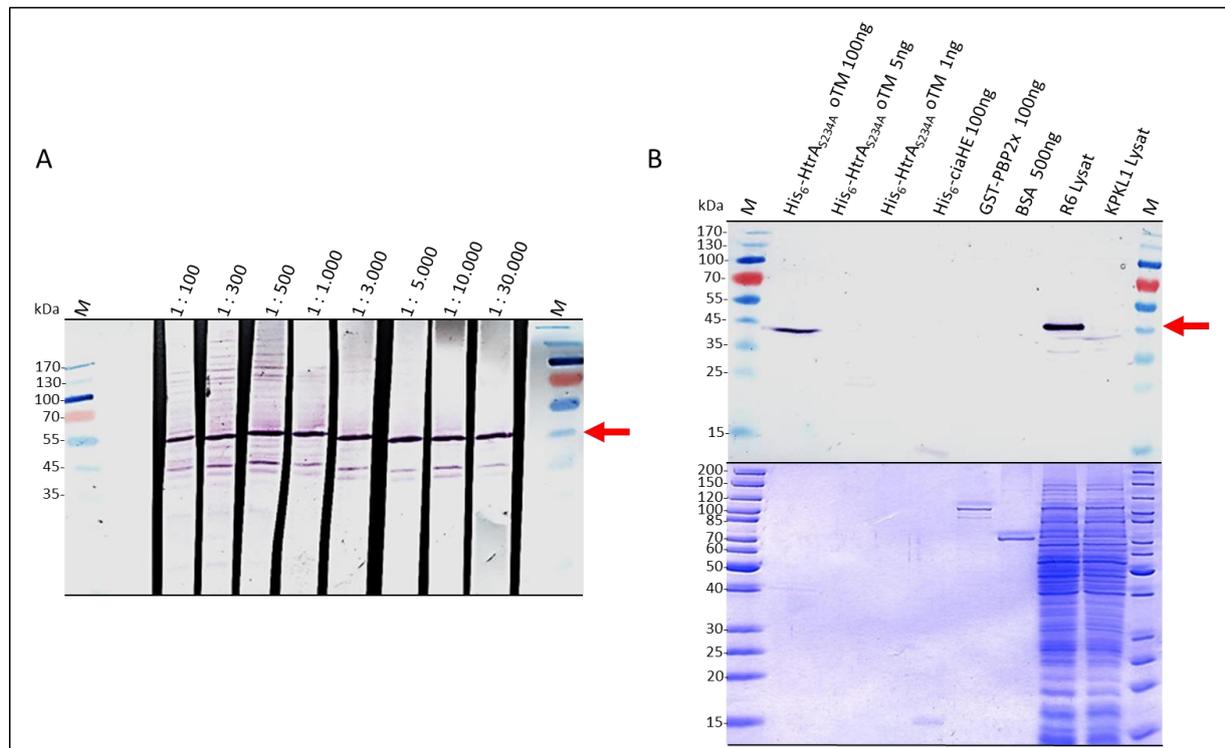


Abb. 3.69: Test der finalen Blutung des Antikörpers α -HtrA 12003. **A:** Dargestellt sind die Ergebnisse des Antikörpertests mittels Western-Blotanalyse zur Ermittlung der optimalen Verdünnung. Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurde in eine große Probetasche 53 μ l des bei einer Zelldichte von N 70 hergestellten Zelllysate von *S. pneumoniae* R6 aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Blot wurde vertikal in Streifen geschnitten, die mit verschiedenen Verdünnungen des primären polyklonalen Antikörpers α -HtrA 12003 inkubiert wurden. Die einzelnen Verdünnungen sind der Abbildung zu entnehmen. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). **B:** Überprüfung der Spezifität des Antikörpers α -HtrA 12003. Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blotanalysen und des Coomassiegels der Kontrollproteine und der Zelllysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen: KPKL1(R6 Δ htrA). Auf zwei 12,5 %ige SDS-Gele wurden jeweils 5 μ l der hergestellten Zelllysate und die Proteine in der angegebenen Konzentration aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde zunächst eins der Gele mit Coomassie gefärbt. M: 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab; unten). Die Proteine des zweiten Gels wurden nach der Auftrennung mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Es erfolgte zunächst eine Inkubation mit der finalen Blutung des primären polyklonalen Antikörper α -HtrA 12003 (1:30.000) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:30.000). M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). Die detektierten HtrA-Proteine (ca. 45 kDa) sind durch einen roten Pfeil markiert.

Anhand der Abb. 3.69 A ist zu erkennen, dass HtrA (ca. 45 kDa) bei allen untersuchten Verdünnungen des Antikörpers α -HtrA 12003 eindeutig detektiert werden kann. Die Verdünnungen 1:100-1:500 weisen zusätzlich zahlreiche unspezifische Proteinbanden auf. In der Verdünnung 1:30.000 wird HtrA gut detektiert und es sind keinerlei unspezifische Proteinbanden zu erkennen. Bei einer 1:100.000 Verdünnung des α -HtrA 12003 Antikörpers wurde HtrA deutlich schwächer detektiert (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die 1:30.000 Verdünnung als die optimalste festgelegt.

In Abb. 3.69 B ist die Überprüfung der Spezifität des Antikörpers α -HtrA 12003 bei einer 1:30.000 Verdünnung dargestellt. Der Antikörper weist eine hohe Spezifität auf, da er in der Lage ist das Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM (100 ng) problemlos zu detektieren, wohingegen die Proteine His₆-ciaHE (100 ng), GST-PBP2_{x_wt} (100 ng) und BSA (500 ng) nicht erkannt werden. Zusätzlich wird deutlich, dass der Antikörper α -HtrA 12003 in der Lage ist das Protein HtrA im Zelllysate des Stamms *S. pneumoniae* R6 zu detektieren. HtrA wird dagegen, wie erwartet, in dem Zelllysate des *htrA*-Deletionsstamms KPKL1 nicht nachgewiesen.

Die Überprüfungen des Antikörpers α -HtrA 12004 lieferten sehr ähnliche Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:30.000 (Daten nicht gezeigt). Beide Antikörper standen für weiterführende Experimente zur Verfügung.

3.11.2 Überexpression des proteolytisch aktiven Proteins HtrA mittels His₆-Tag

Eine proteolytisch aktive Form der Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* wurde für die Durchführung der *in vitro*-Studien benötigt (Kap. 3.12). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression und anschließende Aufreinigung des Proteins His₆-HtrA_{S234A}oTM mittels Nickel-Affinitätschromatographie, aufgrund des Fehlens der membranassoziierten Region am N-Terminus von HtrA, möglich war. Daher sollte auch das proteolytisch aktive HtrA ohne die membranassoziierten AS 2-30 (oTM: ohne Transmembrandomäne) überexprimiert werden. Dafür wurde das hergestellte Plasmid pKP042 (Tab. 2.4) in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Tab. 2.3) Zellen transformiert. Nach

einer Überprüfung der Transformanten wurde das N-Terminale Fusionsprotein His₆-HtrAoTM überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kap. 2.9.5.2). In Abb. 3.70 ist das Ergebnis der Proteinsynthese von His₆-HtrAoTM mit anschließender Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie zu sehen. Die Probe, die nach der Induktion der Kulturen mit IPTG entnommen wurden, weisen drei Proteinbanden auf, die bei der Probe, die vor der Induktion entnommen wurde, nicht zu sehen sind. Bei der Proteinbande mit einer Größe von ca. 40 kDa handelt es sich um das Protein His₆-HtrAoTM (39,6 kDa); was für eine erfolgreiche Proteinsynthese nach der Induktion mit IPTG spricht. Das Protein His₆-HtrAoTM befand sich in der Überstands-, jedoch nicht in der Pelletfraktion. Dies beweist die gute Löslichkeit des Proteins. Eine große Menge des Proteins His₆-HtrAoTM konnte in den Elutionsfraktionen 1 und 2 von der Säule eluiert werden.

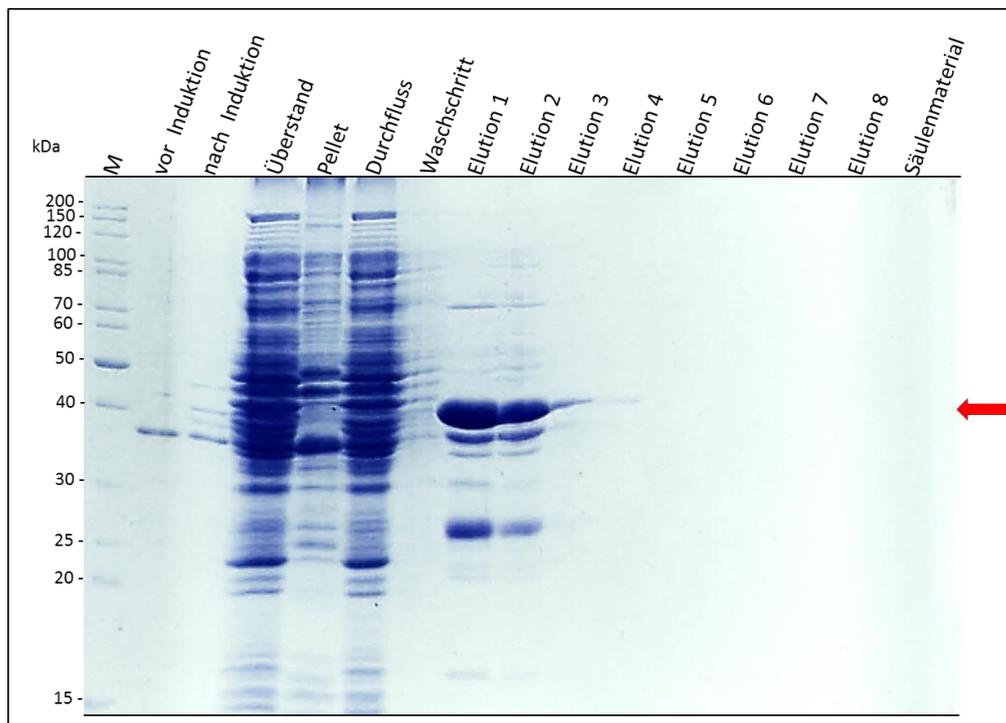


Abb. 3.70: Proteinsynthese der proteolytisch aktiven Form von HtrA im Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist das Ergebnis der Überexpression von His₆-HtrAoTM mit anschließender Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Das Gel zeigt Proben vor und nach der Induktion mit 1 mM IPTG, sowie des Überstandes und des Pellets nach der Behandlung der Zellen mit Ultraschall. Während der Nickel-Affinitätschromatographie wurden Proben des Durchflusses, des Waschschritts, der acht Elutionsfraktionen und des Säulenmaterials entnommen und ebenfalls aufgetragen. jeweils 10 µl pro Probe wurden aufgetragen und mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten His₆-HtrAoTM-Proteins ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet (ca. 39 kDa).

Ähnlich, wie bereits bei der Überexpression der proteolytisch-inaktiven Form von HtrA (His₆-HtrA_{S234A}oTM, Abb. 3.67), können zusätzliche Nebenbanden ausfindig gemacht werden. So ist auch hier ebenfalls zu der His₆-HtrAoTM-Bande bei ca. 40 kDa eine weitere Nebenband bei 25 kDa deutlich zu erkennen. Auch die schwächeren Abbaubanden bei ca. 15 kDa, ca. 70 kDa und bei ca. 100 kDa sind zu sehen. Interessanterweise können unterhalb der His₆-HtrAoTM-Proteinbande (ca. 40 kDa) zwei Nebenprodukte nachgewiesen werden, die zuvor bei der Überexpression von His₆-HtrA_{S234A}

nicht aufgetreten sind. Da das aufgereinigte Fusionsprotein His₆-HtrAoTM proteolytisch aktiv und daher auch zum Eigenabbau durch Autoproteolyse in der Lage sein sollte, könnte es sich bei diesen Proteinen durchaus um Abbauprodukte des Proteins His₆-HtrAoTM handeln. In den Fraktionen 3 und 4 kann das Protein His₆-HtrAoTM nur in sehr geringen Mengen und in den Fraktionen 5-8 überhaupt nicht mehr eluiert werden. Die Probe des Säulenmaterials zeigt kein His₆-HtrAoTM-Protein, was impliziert, dass bereits das komplette vorhandene Protein von der Säule eluiert wurde.

Die His₆-HtrAoTM-Proteine der ersten drei Elutionsfraktionen (Abb. 3.70) wurden mittels PD-10 Säulen entsalzt und in 20 mM Natriumphosphatpuffer umpufferert. In Abb. 3.71 ist ein SDS-Gel dieser Proben zu sehen.

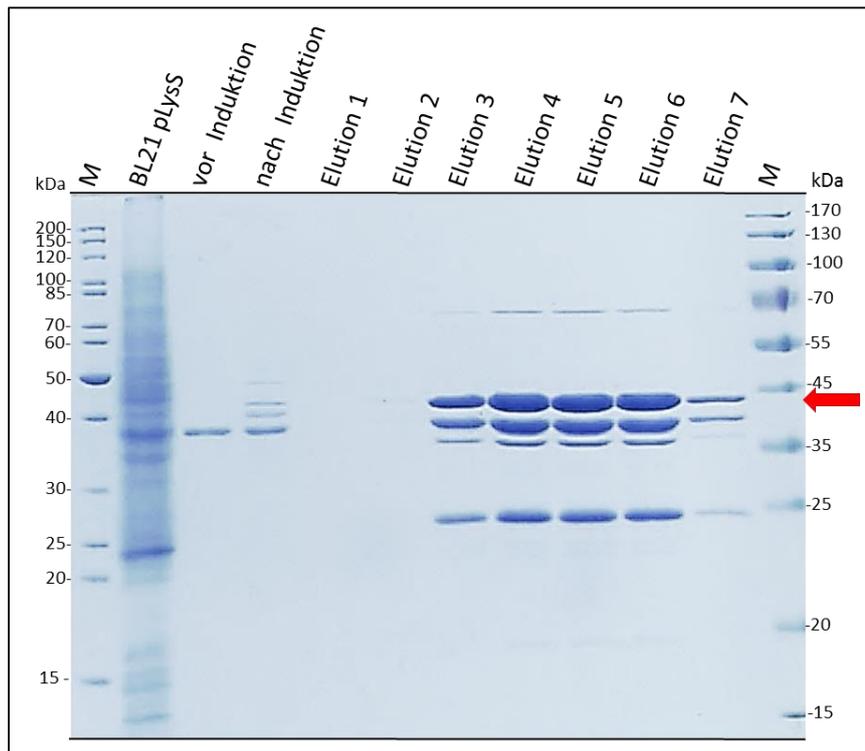


Abb. 3.71: Umpufferung und Entsalzung der proteolytisch aktiven Form von HtrA. Dargestellt sind jeweils sieben Elutionsfraktionen nach der Umpufferung des His₆-HtrAoTM-Fusionsproteins mittels PD-10 Säule. Zur Kontrolle sind die Proben vor und nach der Induktion ebenfalls gezeigt. Jeweils 10 µl pro Probe wurden mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M: 5 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage des überexprimierten His₆-HtrAoTM-Proteins ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet (ca. 39 kDa).

Auch hier zeigen sich bei allen Elutionsfraktionen neben dem His₆-HtrAoTM Protein (ca. 40 kDa) zwei weitere Abbaubanden unmittelbar unterhalb des Proteins (bei ca. 37 kDa und bei ca. 35 kDa). Anhand von Western-Blotanalysen mit α -HtrA-Antikörpern wurden die Proben vor- und nach der Induktion, sowie einzelne Elutionfraktionen der Aufreinigung des Proteins His₆-HtrAoTM untersucht. Die beiden Proteinbanden unmittelbar unterhalb von His₆-HtrAoTM konnten dabei detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass diese auf den Eigenabbau von HtrA durch Autodigestion zurückzuführen sind. In der Probe nach der Induktion (Abb. 3.70 und Abb. 3.71) sind die beiden Abbauprodukte (bei ca. 37 kDa und bei ca. 35 kDa) zu sehen. Neben diesen beiden Abbauprodukten konnten

noch zahlreiche kleinere Abbauprodukte in der Probe nach der Induktion mittels Western-Blot mit α -HtrA-Antikörpern detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies beweist, dass das Protein His₆-HtrAoTM in der Lage ist sich bereits vor der Elution, direkt an der Säule, selbst abzubauen.

3.12 *In vitro*-Studien

3.12.1 Interaktionsstudien mit β -Casein als Substrat

Die proteolytische Aktivität des überexprimierten His₆-HtrAoTM-Protein sollte anhand von Interaktionsstudien nachgewiesen werden. Als Substrat für die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* diente dabei β -Casein, für das eine offene Konformation und das Fehlen einer ausgeprägten Tertiärstruktur (Livney *et al.*, 2004) kennzeichnend sind.

Anhand von Vorversuchen wurde zunächst nach möglichst optimalen Bedingungen für die Abbaureaktion von β -Casein durch HtrA gesucht. Dafür wurden fünf unterschiedliche Reaktionspuffer (Tab. 2.49), die für den Abbau von β -Casein durch das Protein der HtrA-Familie DegP aus *E. coli* bzw. durch HtrA aus *S. pneumoniae* beschrieben wurden (Skórko-Glonek *et al.*, 1995; Sebert *et al.*, 2005; Cassone *et al.*, 2012), getestet.

Die *in vivo*-Studien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, belegten eine proteolytische Aktivität von HtrA aus *S. pneumoniae* sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C. Daher wurden innerhalb der Vorversuche zur Aktivität von HtrA zwei Reaktionstemperaturen (bei 30 °C und bei 37 °C) analysiert. Die Vorversuche wurden wie unter Kap. 2.10.1 beschrieben, durchgeführt.

Es wurden zwei unterschiedlich behandelten Proben einer Isolation des Proteins His₆-HtrAoTM untersucht. Eine Probe wurde nach der Isolation auf Eis gehalten und zeitnah in den Vorversuch eingesetzt und eine andere wurde zuvor in flüssigem Stickstoff weggefroren und vor der Verwendung erneut aufgetaut. Die Aktivität des zuvor schockgefrorenen Proteins war in allen Versuchen im Vergleich zu dem nicht weggefrorenen deutlich erhöht und lieferte bessere Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der *in vitro* β -Casein Assays der Elutionsfraktion, die zuvor weggefroren wurde, sind der Abb. 3.72 zu entnehmen.

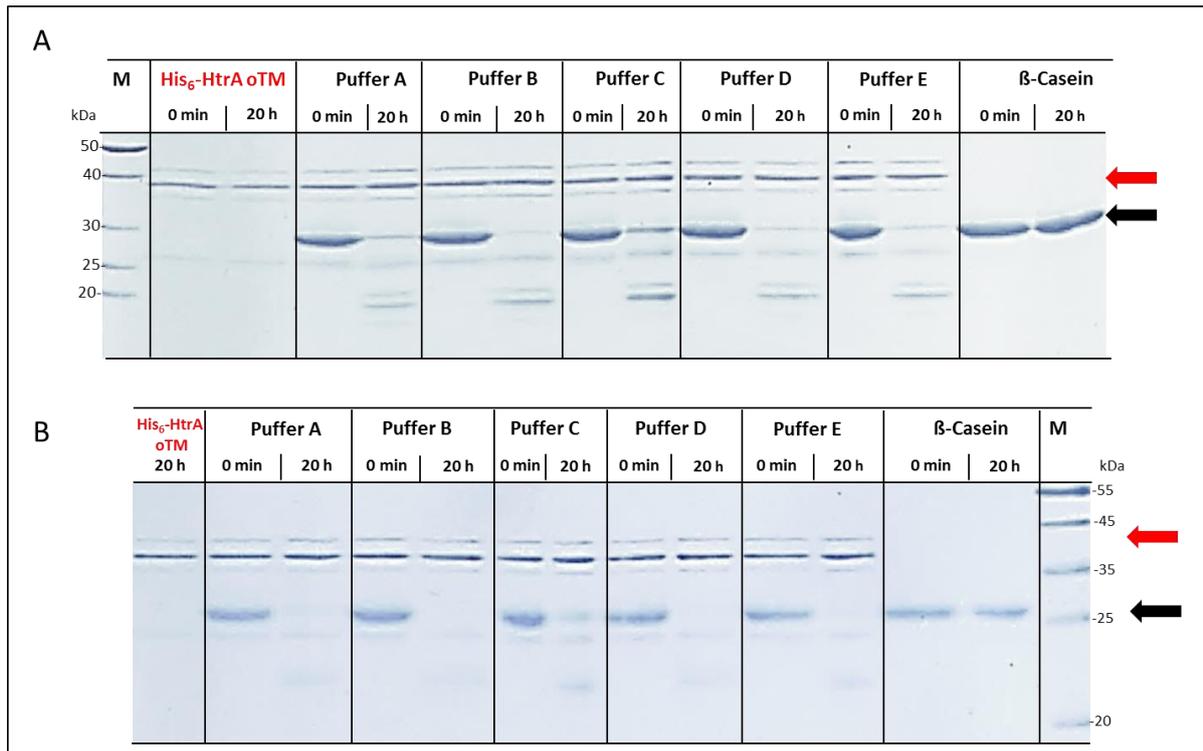


Abb. 3.72: Test der Puffer für die Abbaureaktion von β -Casein durch das zuvor schockgefrorene Protein His₆-HtrAoTM. Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro* β -Casein Assays in unterschiedlichen Reaktionspuffern. Die getesteten Puffer sind der Abbildung zu entnehmen: Puffer A: 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Sebert *et al.*, 2005); Puffer B: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; Puffer C: 50 mM Tris-HCl, pH 8 (Skórko-Glonek *et al.*, 1995); Puffer D: 50 mM HEPES-HCl, pH 7,3; Puffer E: 1x PBS (nach Cassone *et al.*, 2012). Pro Reaktionsansatz wurden 5 μ g des gereinigten Proteins His₆-HtrAoTM mit 25 μ g des Substrats β -Casein gemischt und der Reaktionsansatz mit dem jeweiligen Reaktionspuffer aufgefüllt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 25 μ g β -Casein. Die Proben wurden bei 37 °C (**A**) bzw. 30 °C (**B**) im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min) und nach erfolgter Inkubation (20 h) jeweils 20 μ l Probe entnommen. In einer 15 %iger SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (oben): 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab) unten: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab). Die markierten His₆-HtrAoTM-Proteine (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) bzw. β -Casein (ca. 25 kDa, schwarzer Pfeil) Proteine sind markiert.

Bei den Proteinen His₆-HtrAoTM (roter Pfeil, ca. 39 kDa) und β -Casein (schwarzer Pfeil, ca. 25 kDa), die zur Kontrolle alleine aufgetragen wurden, zeigten sich nach 20 h Inkubation bei 37 °C (**A**) bzw. 30 °C (**B**) keinerlei Unterschiede zu den Proben nach 0 min. Diese beiden Proteine waren in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 gelöst. Das Protein der Serinprotease wurde nicht in Form der Proteinbande von ca. 40 kDa nachgewiesen, sondern lag in Form von drei detektierbaren Proteinbanden vor; wobei die Bande mit der mittleren Größe in deutlich höheren Mengen vorlag. Diese drei Proteinbanden konnten bereits bei der Überexpression des Proteins His₆-HtrAoTM beobachtet werden (Abb. 3.70). Die His₆-HtrAoTM-Proteinbande wurde in reduzierter Menge nachgewiesen, wohingegen die Menge der direkt unterhalb gelegenen erhöht war. Die zwei kleineren Proteinbanden wurden zuvor eindeutig als Abbaubanden des Proteins His₆-HtrAoTM nachgewiesen und dies auf einen Selbstabbau durch die Autoproteolyse des aktiven HtrAs zurückgeführt.

Das Wegfrieren und Auftauen des Proteins führt zu einem verstärkten Selbstabbau der Serinprotease HtrA, was auch die proteolytische Aktivität belegt.

Nach der 20-stündigen Inkubation bei 37 °C konnte das Substratprotein β -Casein in allen Reaktionsansätzen in deutlich geringerer Menge nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten sich in allen Reaktionsansätzen zwei Abbauprodukte; eins bei ca. 20 kDa und eins direkt unterhalb von 20 kDa. In der Probe des Reaktionsansatzes mit dem Puffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8, Skórko-Glonek *et al.*, 1995) wies die Serinprotease die schwächste proteolytische Aktivität auf. Die β -Caseinmenge war nach 20-stündiger Inkubation mit dem Protein His₆-HtrAoTM bei 37 °C zwar geringer als bei der Probe nach 0 min; im Vergleich zu den Mengen in den anderen Ansätzen jedoch noch deutlich höher.

Auch nach 20 h Inkubation bei 30 °C wies der Puffer C die schlechtesten Resultate auf. In den Reaktionsansätzen mit den Puffern A, B, D und E konnte β -Casein nach 20-stündiger Inkubation bei 30 °C nicht mehr nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass in diesen Fällen das Substrat β -Casein durch die Serinprotease His₆-HtrAoTM komplett abgebaut wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der durchgeführten Vortests ein Abbau des Substratproteins β -Casein durch die Serinprotease HtrA belegt wurde, wobei das Wegfrieren und erneute Auftauen die Aktivität des Proteins His₆-HtrAoTM deutlich gesteigert hat. Zusätzlich zeigte sich ein verstärkter Abbau des Substrats bei 30 °C. Die Ergebnisse des Puffervortests zeigten weiterhin, dass Puffer D (50 mM HEPES-HCl, pH 7,3) und Puffer E (1x PBS) als Reaktionspuffer am besten geeignet waren (Daten teilweise nicht gezeigt). Eine Studie von Cassone *et al.*, 2012 konnte ebenfalls nachweisen, dass das Protein HtrA (ohne Signalpeptid) aus *S. pneumoniae* in 1x PBS proteolytisch aktiv war, wohingegen die proteolytische Aktivität in Reaktionspuffern mit hohem Salzgehalt nicht beobachtet werden konnte. Da sich dies mit den hier gezeigten Experimenten deckt, wurden alle weiteren *in vitro*-Studien mit HtrA bei optimierten Bedingungen durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde ausschließlich 1x PBS verwendet und die His₆-HtrAoTM-Proteine wurden vor der Verwendung zunächst schockgefroren und erneut aufgetaut.

In den folgenden *in vitro*-Studien mit HtrA und β -Casein wurde die eingesetzte Menge an Substrat pro Reaktionsansatz optimiert und daher um die Hälfte reduziert (von 25 μ g auf 12,5 μ g), um Unterschiede im Abbau von β -Casein besser detektieren zu können. Zusätzlich wurden dem Reaktionsansatz nach 30 min und nach 4 h Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Reaktionsansätze unter gleichen Bedingungen mit dem Protease-inaktiven Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM angesetzt. Die Abbaureaktionen wurden bei 30 °C erkundet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 3.73 zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das proteolytisch inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM (grüner Pfeil) wie erwartet verhält: Es ist nicht in der Lage β -Casein (schwarzer Pfeil) abzubauen.

Der Abbau des β -Caseins durch das aktive Protein His₆-HtrAoTM konnte unter den optimierten Bedingungen bei 30 °C nachgewiesen werden. Bereits nach 4-stündiger Inkubation des Reaktionsansatzes bei 30 °C wurde nahezu kein β -Casein mehr nachgewiesen, da es von His₆-HtrAoTM abgebaut

worden war. Zusätzlich wies das proteolytisch aktive Protein His₆-HtrAoTM (roter Pfeil) eine kleinere Größe auf, als das Protease-inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM (ca. 40 kDa). Dieses Phänomen wurde bereits von Cassone *et al.*, 2012 beschrieben und auf den Selbstabbau von HtrA durch Autoproteolyse zurückgeführt.

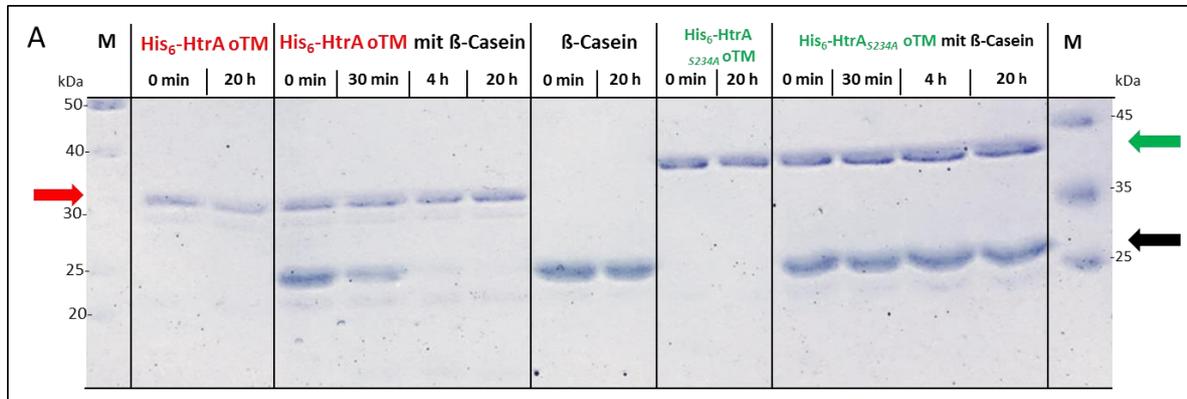


Abb. 3.73: *In vitro* β -Casein Assays mit His₆-HtrAoTM und His₆-HtrA_{S234A}oTM bei optimierten Bedingungen. Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro* β -Casein Assays in 1x PBS bei 30 °C. Pro Reaktionsansatz wurden 5 μ g des gereinigten, zuvor schockgefrorenen Proteins His₆-HtrAoTM mit 12,5 μ g des Substrats β -Casein gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x PBS aufgefüllt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 12,5 μ g β -Casein und Reaktionsansätze, denen das Protease-inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM zugegeben wurde. Die Proben wurden bei 30 °C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min), nach 30 min, nach 4 h und nach 20 h Inkubation jeweils 20 μ l Probe entnommen. In einer 15 %igen SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (links): 4 μ l Proteinmarker II (PeqLab), M (rechts): 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (PeqLab). Die markierten His₆-HtrAoTM-Proteine (kleiner als 39 kDa, roter Pfeil) bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteine (ca. 39 kDa, grüner Pfeil) und β -Casein- (ca. 25 kDa, schwarzer Pfeil) Proteine sind markiert.

3.11.2 Interaktionsstudien mit PBP2x als Substrat

Der Abbau der essentiellen veränderten PBP2x-Proteine, der Laborstämme *S. pneumoniae* C405 bzw. C606, durch die Serinprotease HtrA wurde im Rahmen dieser Arbeit in zahlreichen *in vivo*-Experimenten sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C belegt und genaustens analysiert. Zur Verifizierung dieser Daten unter *in vitro*-Bedingung wurden Interaktionsstudien mit dem aktiven His₆-HtrAoTM-Protein und unterschiedlichen PBP2x-Substraten durchgeführt. In diesen *in vitro*-Assays wurden zunächst die GST-Fusionsproteine GST-PBP2x aus C405 und C606 als mögliche Substrate für das proteolytisch aktive Protein His₆-HtrAoTM getestet. Die experimentelle Vorgehensweise wurde bereits unter Kap. 2.10.2 beschrieben. Reaktionsansätze mit dem proteolytisch inaktiven Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM wurden ebenfalls als Kontrolle analysiert.

In der Abb. 3.74 sind die *in vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und GST-PBP2x_{C405} als Substrat zu sehen. Unter A sind dabei die ermittelten Ergebnisse bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C gezeigt, während unter B die Resultate, die bei 30 °C erzielt wurden, zu finden sind. Das bereits erläuterte Phänomen der geringeren Größe des aktiven His₆-HtrAoTM (roter Pfeil) im Vergleich zu His₆-HtrA_{S234A}oTM (grüner Pfeil) ist erneut deutlich zu erkennen.

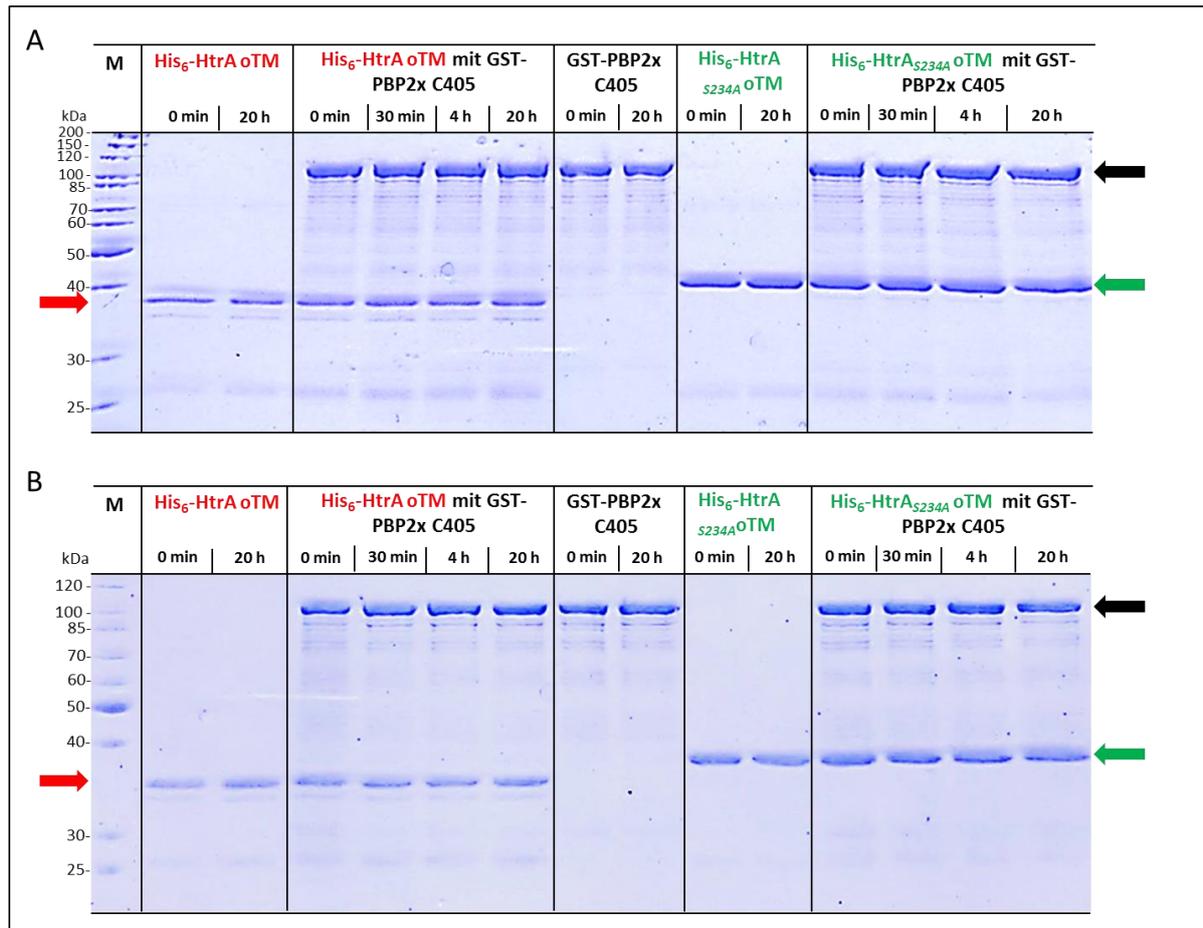


Abb. 3.74: *In vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM und GST-PBP2x_{C405} als Substrat. Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro*-Assays in 1x PBS bei 37 °C (A) und bei 30 °C (B). Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten, zuvor schockgefrorenen Proteins His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM mit 12,5 µg des Substrats GST-PBP2x_{C405} gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x PBS aufgefüllt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 12,5 µg β-Casein und Reaktionsansätze, denen das Protease-inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM zugegeben wurde. Die Proben wurden bei 37 °C bzw. 30 °C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min), nach 30 min, nach 4 h und nach 20 h Inkubation jeweils 20 µl Probe entnommen. In einer 15 %iger SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (links): 4 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die markierten His₆-HtrAoTM-Proteine (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteine (ca. 39 kDa, grüner Pfeil) und GST-PBP2x_{C405}- (ca. 100 kDa, schwarzer Pfeil) Proteine sind markiert.

Das getestete, mögliche Substratprotein GST-PBP2x_{C405} (PBP2x aus C405 ab AS 49-750) hat eine Größe von ca. 100 kDa. Die Lage des Proteins ist in A und B durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die 20-stündige, alleinige Inkubation des GST-PBP2x_{C405} bei 37 °C bzw. 30 °C führt zu keinerlei nachweislichen Veränderungen. Das GST-PBP2x_{C405} wird wie erwartet, weder bei 37 °C, noch bei 30 °C durch das Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM abgebaut. Allerdings zeigt sich auch nach 20 h Inkubation bei 37 °C und auch bei 30 °C kein Abbau durch die aktive Serinprotease His₆-HtrAoTM.

In weiteren *in vitro*-Studien, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass das Protein GST-PBP2x_{C606} (PBP2x aus C606 ab AS 49-750) durch His₆-HtrAoTM weder bei 30 °C, noch bei 37 °C abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt). Bei den untersuchten Proteinen handelt es sich um PBP2x-Proteine, die N-terminal an einen GST-Tag fusioniert wurden. Zusätzlich fehlt ihnen die Transmembrandomäne von PBP2x. Der GST-Tag ist mit 26 kDa relativ groß und

behindert möglicherweise auf räumliche Weise die Interaktion zwischen der aktiven Serinprotease His₆-HtrAoTM und dem Substrat. Um zu untersuchen, ob sich die Abwesenheit des GST-Tags positiv auswirkt und den Abbau durch die Serinprotease His₆-HtrAoTM ermöglicht, wurde den Proteinen der GST-Tag mit Hilfe der PreScission Protease abgespaltet. Anschließend wurden weitere *in vitro*-Studien mit diesen Proteinen durchgeführt. Um eine Reaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat zu erleichtern, wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl reduziert. Die eingesetzte Menge an Substratprotein pro Reaktionsansatz wurde auf 6,25 µg reduziert, um mögliche Unterschiede in der Proteinmenge besser nachweisen zu können.

Vor kurzem wurde für das proteolytisch aktive HtrA (ohne Signalpeptid) aus *S. pneumoniae* gezeigt, dass die Zugabe von β-Casein zu einer Steigerung der Proteaseaktivität führt (Cassone *et al.*, 2012). Um diesen Sachverhalt bei den hier durchgeführten *in vitro*-Studien mit berücksichtigen zu können, wurde einem Reaktionsansatz zusätzlich 1 µg β-Casein zugegeben. In Abb. 3.75 sind die bei 37 °C durchgeführten *in vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2_xC405 zu sehen.

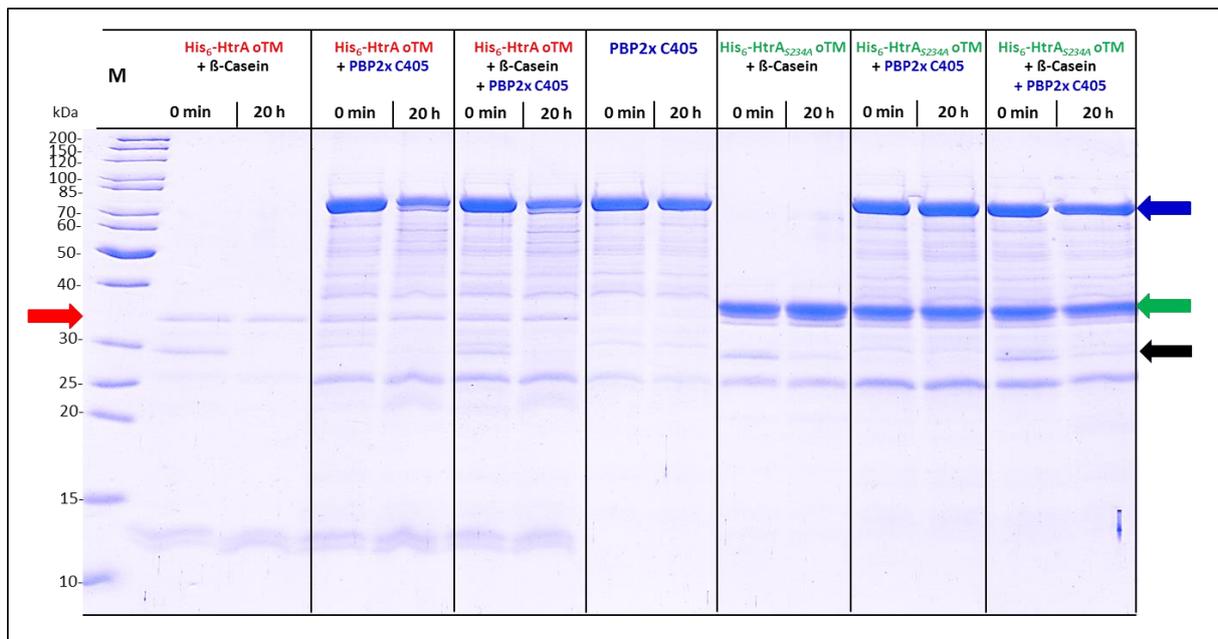


Abb. 3.75: *In vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2_xC405 als Substrat bei 37 °C. Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro*-Assays in 1x PBS bei 37 °C. Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten, zuvor schockgefrorenen Proteins His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM mit 6,25 µg des Substrats PBP2_x C405 (AS 49-750) gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x PBS auf 50 µl aufgefüllt. Jeweils einem Reaktionsansatz wurde zusätzlich 1 µg β-Casein zugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 5 µg His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM dem 1µg β-Casein zugegeben wurde und eine Reaktionsansatz mit 6,25 µg PBP2_x C405 (AS 49-750). Die Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min) und nach 20 h Inkubation jeweils 20 µl Probe entnommen. In einer 15 %iger SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (links): 4 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage der His₆-HtrAoTM-Proteine (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM Proteine (ca. 39 kDa, grüner Pfeil), β-Casein-Proteine (ca. 25 kDa, schwarzer Pfeil) und der PBP2_xC405-Proteine (ca. 100 kDa, blauer Pfeil) sind markiert.

Aus Abb. 3.75 wird ersichtlich, dass die Proteine His₆-HtrAoTM bei ca. 35 kDa in deutlich geringeren Mengen zu sehen sind, als die His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteine. Die Konzentration dieser Proteine wurde zuvor mittels Nanodrop und mit Hilfe eines Bradfordassays möglichst genau bestimmt. Die Unterschiede lassen sich anhand der zwei zusätzlichen Proteinbanden (zwischen 10 und 15 kDa) erklären, die in allen Reaktionsansätzen, die das His₆-HtrAoTM-Protein beinhalten, nachgewiesen werden konnten. Diese Proteinbanden, bei denen es sich möglicherweise um Abbauprodukte von HtrA handelt, wurden demnach bei den Konzentrationsbestimmungen unwissentlich mit gemessen und verfälschten dadurch die ermittelten Konzentrationswerte.

Die Aktivität des His₆-HtrAoTM-Proteins wird, durch den erfolgreichen Abbau des β -Caseins in allen drei Reaktionsansätzen, belegt. Interessanterweise zeigt das Experiment auch, dass das proteolytisch inaktive Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM in der Lage ist das zugefügte β -Casein teilweise abzubauen.

Daher lässt sich schlussfolgern, dass durch das Einbringen der S234A Mutation in die katalytische Triade der Serinprotease HtrA, die proteolytische Aktivität nicht komplett inhibiert wird. Vielmehr ist in dem Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM eine deutlich geringere Restaktivität vorhanden. Die Reaktionsansätze mit dem Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM lassen keinen Abbau des PBP2x_{C405}-Proteins (AS 49-750) erkennen. Demnach ist His₆-HtrA_{S234A}oTM zwar in der Lage die geringe Konzentration von β -Casein in dem Reaktionsansatz abzubauen; die geringe proteolytische Restaktivität in diesem Protein ist jedoch für den Abbau des PBP2x_{C405}-Proteins (AS 49-750) nicht ausreichen.

Ferner konnte der Abbau des Substratproteins PBP2x C405 (AS 49-750) durch die proteolytisch aktive Serinprotease His₆-HtrAoTM sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von β -Casein bewiesen werden. Dies äußert sich zum einen durch eine verringerte Menge des Substratproteins (bei ca. 100 kDa) und zum andern durch eine Veränderung des Musters an Abbauproteinen, die in der Probe PBP2x_{C405} enthalten sind.

Wenn dem Protein His₆-HtrAoTM sowohl β -Casein, als auch PBP2x als Substratproteine zur Verfügung stehen, ist das Enzym in der Lage die geringe Menge an β -Casein komplett abzubauen und zusätzlich das Protein PBP2x C405 deutlich in der Menge zu reduzieren. Es konnte allerdings unter den getesteten Bedingungen kein deutlicher aktivitätssteigernder Effekt nachgewiesen werden, der auf die Zugabe von β -Casein zurückzuführen ist.

Die beschriebenen *in vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2x_{C405} als Substrat wurden unter Einhaltung der gleichen Bedingunge ebenfalls bei 30 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.3 (Anhang) zu sehen. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zu den unter Abb. 3. 80 dargestellten und bereits beschriebenen Daten. Demnach wurde durch die *in vitro*-Studien der Abbau des PBP2x C405 (AS 49-750) durch die Serinprotease HtrA bei 30 °C und bei 37 °C erfolgreich bestätigt.

Für das Protein PBP2x_{C606}, das im Gegensatz zu PBP2x aus C405, sogar vier AS-Austausche in PBP2x beinhaltet, wurde mittels *in vivo*-Studien ein noch stärkerer Abbau durch die Serinprotease HtrA nachgewiesen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Daten durch *in vitro*-Studien bestä-

tigt werden können. Diese Experimente wurden allerdings im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.

Vorangegangene Depletionsexperimente zur Verringerung des essentiellen GFP-PBP2x in den Stamm DKL031 und dem *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 (Kap. 3.9.3, Abb. 3.6.4) zeigten, dass das Fusionsprotein GFP-PBP2x ebenfalls durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird. Ergebnisse der Western-Blotanalysen mit α -GFP-Antikörpern (Kap. 3.8.3, Abb. 3.51) und Lokalisationsstudien dieser Stämme (Kap. 3.8.3, Abb. 3.53) bestätigten diesen Sachverhalt. Unklar blieb dabei jedoch, ob der Abbau des Fusionsproteins GFP-PBP2x durch HtrA zustande kommt, weil die Struktur durch die Fusion verändert wurde, was die Stabilität des Proteins negativ beeinflussen und dadurch einen Abbau fördern könnte. Andererseits wäre es denkbar, dass das essentielle Zellteilungsprotein PBP2x auch in *S. pneumoniae* R6 in geringen Maßen durch die Serinprotease HtrA kontrolliert abgebaut wird und die Menge an PBP2x in der Zelle dadurch reguliert wird.

Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurden *in vitro*-Studien mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2x_{wt} (PBP2x aus *S. pneumoniae* R6 AS49-750) bei 30 °C und bei 37 °C durchgeführt. Die Ergebnisse, die bei einer Inkubation der Proben bei 37 °C erzielt wurden, sind der Abb. 3.76 zu entnehmen.

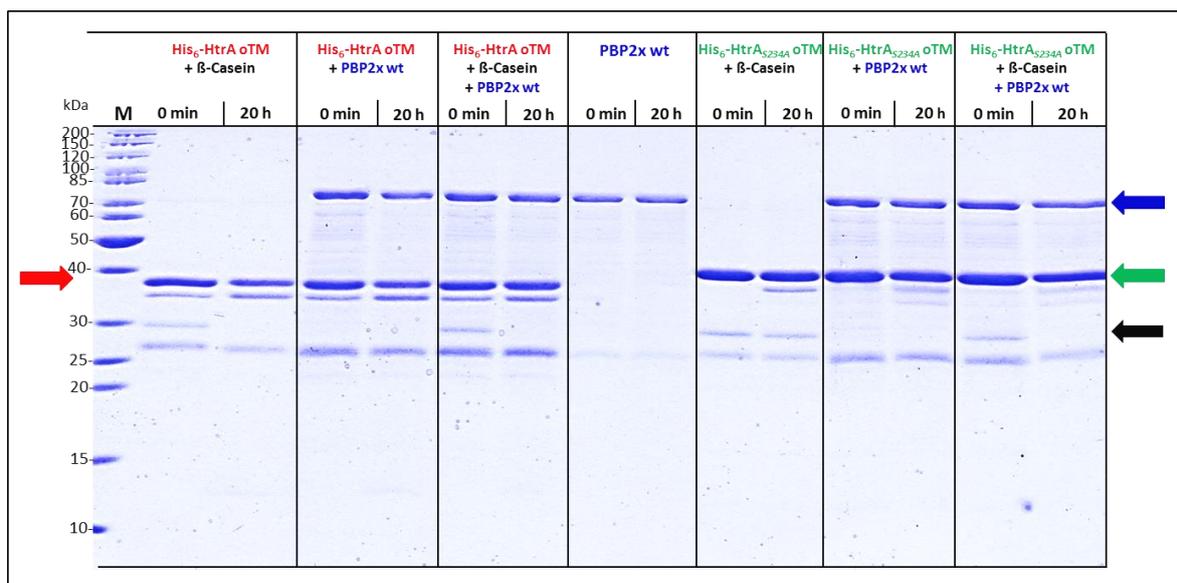


Abb. 3.76: *In vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2x_{wt} als Substrat bei 37 °C. Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro*-Assays in 1x PBS bei 37 °C. Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten, zuvor schockgefrorenen Proteins His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM mit 6,25 µg des Substrats PBP2x wt (AS 49-750) gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x PBS auf 50 µl aufgefüllt. Jeweils einem Reaktionsansatz wurde zusätzlich 1 µg β -Casein zugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 5 µg His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM dem 1 µg β -Casein zugegeben wurde und ein Reaktionsansatz mit 6,25 µg PBP2x_{wt} (AS 49-750). Die Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min) und nach 20 h Inkubation jeweils 20 µl Probe entnommen. In einer 15 %iger SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (links): 4 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage der His₆-HtrAoTM (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteine (ca. 39 kDa, grüner Pfeil), β -Casein-Proteine (ca. 25 kDa, schwarzer Pfeil) und der PBP2x_{wt}-Proteine (ca. 100 kDa, blauer Pfeil) sind markiert.

Innerhalb dieses Experiments erschien His₆-HtrAoTM in Form einer Doppelbande, wobei die His₆-HtrAoTM-Proteinbande (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) in größeren Mengen vorlag, als das Abbauprodukt der Serinprotease (direkt unterhalb). Die proteolytische Aktivität des Proteins His₆-HtrAoTM wurde durch den Abbau von β -Casein in den Proben nach 20-stündiger Inkubation bei 37 °C bestätigt.

Das Protein His₆-HtrA_{S234A}oTM war zwar in einem Reaktionsansatz dazu in der Lage β -Casein abzubauen, konnte jedoch PBP2_{x_{wt}} nicht verdauen. Interessanterweise zeigt sich bei allen drei Reaktionsansätzen mit His₆-HtrA_{S234A}oTM nach einer 20-stündigen Inkubation bei 37 °C eine Proteinbande direkt unterhalb des Enzyms His₆-HtrA_{S234A}oTM. Aufgrund der Größe dieser Proteinbande kann ein leichter Abbau des Proteins His₆-HtrA_{S234A}oTM durch sich selbst vermutet werden. Bei den Proben, die den Reaktionsansätzen mit His₆-HtrAoTM und PBP2_{x_{wt}} nach 20 h bei 37 °C entnommen wurden, zeigt sich ein minimaler Abbau des Substrats PBP2_{x_{wt}} durch die Serinprotease HtrA.

Der Abbau von PBP2_{x_{wt}} durch die Serinprotease HtrA konnte anhand von weiteren Studien bei 30 °C nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei allen durchgeführten *in vitro*-Experimenten konnte auch kein Aktivität-steigernder Effekt auf HtrA nachgewiesen werden, der mit der Zugabe von β -Casein in den Reaktionseinsatz in Zusammenhang gebracht werden konnte.

Um den geringen Effekt, der bei 30 °C nachgewiesen werden konnte zu bestätigen, wurden weitere *in vitro*-Assays mit diesen Proteinen durchgeführt, wobei die Substratkonzentration von PBP2_{x_{wt}} auf 2 μ g je Reaktionsansatz reduziert wurde. Die Ergebnisse dieser Analysen verifizierten den geringen Abbau von PBP2_{x_{wt}} (AS 49-750) durch die Serinprotease HtrA nach 20-stündiger Inkubation bei 37 °C (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Quantifizierungsstudien mit PBP2x

4.1.1 Quantifizierung der Molekülmenge von PBP2x in der *S. pneumoniae* R6 Zelle

Dem Penicillin-Bindeprotein 2x kommt in *S. pneumoniae* eine entscheidende Bedeutung zu, da dieses Enzym zum einen essentiell ist (Kell *et al.*, 1993) und zum anderen, als wichtigste primäre Resistenzdeterminante, maßgeblich an der β -Laktam-Resistenz beteiligt ist. Für die Betrachtung der enzymatischen Reaktion von PBP2x spielt die Anzahl der Moleküle in der *S. pneumoniae* Zelle eine wichtige Rolle. Daher wurde diese bereits in zwei voneinander unabhängigen Studien bestimmt (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005; Rutschmann, 2011), wobei stark abweichende Ergebnisse erzielt wurden. Daher wurde die PBP2x-Molekülmenge des Wildtypstamms *S. pneumoniae* R6 im Rahmen dieser Arbeit erneut quantitativ mittels Western-Blotanalysen mit ECL ermittelt, wobei ein Wert von 17.700 PBP2x-Moleküle/Zelle erhalten wurde. Wurde die Lebendkeimzahl zuvor mittels Ausplattierung bestimmt, führte dies zu einem Ergebnis von 22.650 PBP2x-Moleküle/cfu. Die hier ermittelte PBP2x-Molekülmenge liegt im gleichen Größenbereich, wie die Ergebnisse einer zuvor durchgeführten Arbeit (Rutschmann, 2011: 18.545 Molekülen PBP2x pro Zelle). Rutschmann verwendete für seine Quantifizierungsstudien ebenfalls den primären polyklonalen affinitätsgereinigten α -PBP2x-Antikörper. Als Standard diente ein PBP2x-Derivat, dem der Transmembranbereich fehlte. Jedoch wurden die Quantifizierungsstudien in Form einer herkömmlichen Western-Blotanalyse durchgeführt. Diese Methode birgt den großen Nachteil, dass bei der Detektion der Signale bereits schnell ein Sättigungsbereich erreicht wird, was wiederum die Ergebnisse verfälschen kann. Um diese Problematik zu umgehen, wurde die in dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung mittels quantitativer Western-Blotanalyse mit ECL durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse bei der Detektion des GST-PBP2x_{wt}, das als Standardprotein diente, einen Signalabbruch bei 200 und 100 ng (Abb. 3.3), der in allen weiteren Experimenten ebenfalls beobachtet wurde. In diesem Bereich sollte die Detektion mit Hilfe dieser Methode jedoch noch problemlos möglich sein. Eine weitere Unstimmigkeit trat auf, da bei den hochkonzentrierten Proben des Standardproteins GST-PBP2x_{wt} zahlreiche zusätzliche Abbaubanden von PBP2x detektiert wurden. Diese Banden wurden bei der Quantifizierung der Bandenintensität zwar nicht berücksichtigt, könnten aber ebenso wie das Phänomen des Signalabbruchs die Ergebnisse verfälschen. Die detektierten Abbauprodukte wurden bereits bei der Überexpression des GST-PBP2x_{wt}-Fusionsproteins beobachtet (Abb. 3.11), was darauf hindeutet, dass diese Methode verbessert werden könnte. Ähnliche Abbaubanden des aufgetragenen Standardproteins PBP2x_{sol} wurden auch von Rutschmann beobachtet (Rutschmann, 2011).

In einer weiteren Studie wurden die Molekülmengen von den Proteinen DivIC, DivIB, FtsL, PBP2b und PBP2x pro cfu in *S. pneumoniae* quantitativ bestimmt (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005). Im Fall von PBP2x wurde dabei eine deutlich geringere Menge von 260 ± 60 Molekülen pro cfu ($1,6 \times 10^9$) ermittelt. Die genaue Bestimmung der Molekülmenge ist in dieser Veröffentlichung jedoch recht vage be-

schrieben. Die Bestimmung erfolgte ebenfalls nach der quantitativen Methode des Western-Blots mittels ECL, allerdings wurden neben der extrazelluläre Domäne (AS 49-750) des Proteins PBP2x noch weitere Standards verwendet (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005). Weiterhin wurde beim Western-Blot eine zusätzliche Membran verwendet, um sicher zu stellen, dass keine Proteine durch die erste Membran geblottet wurden, was das Ergebnis verfälschen könnte. Die Verwendung mehrerer Standards und mögliche weitere Unterschiede innerhalb der Experimente von Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005 könnten das ermittelte Ergebnis erklären.

Pucci und Dougherty, 2002 haben die Menge der einzelnen PBP-Moleküle pro Zelle in einem Methicillin-sensitiven und einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stamm anhand der Bindung des radiogelabelten Benzylpenicillin untersucht und dabei 3-stellige Werte von 150-825 PBPs pro Zelle ermittelt. Auch die Bestimmung der Molekülmengen der einzelnen PBPs pro *E. coli* Zelle mittels [³H] Benzylpenicillin Radiomarkierung lieferte ähnliche Werte im Bereich von 120-387 (Dougherty *et al.*, 1996). Allerdings können die in unterschiedlichen Organismen ermittelten PBP-Molekülmengen nur recht subjektiv miteinander verglichen werden. Zudem ist die Methode, bei der radioaktives Penicillin verwendet wird, nachweislich mit einer großen Fehlerbreite behaftet. Die in dieser Arbeit ermittelte PBP2x-Menge von ca 20.000 Molekülen pro Zelle stellt für ein wesentliches biosynthetisches Enzym eine vernünftige Größenordnung dar.

4.1.2 Quantifizierung des Mengenunterschieds an PBP2x in C405 und R6

Die zwei Cefotaxim-resistenten Laborstämme C405 und C606 weisen interessanterweise eine deutlich geringere Menge des essentiellen Proteins PBP2x auf (Maurer *et al.*, 2008; Peters, 2009) und sind durchaus lebensfähig. In dem Laborstamm C606 wurde eine noch geringere PBP2x-Menge detektiert als in dem Stamm C405 (Abb. 3.13); allerdings erwies sich dieser auch als genetisch instabil. Da im Rahmen dieser Arbeit daher hauptsächlich mit dem Stamm *S. pneumoniae* C405 weitergearbeitet wurde und er als Ausgangsstamm für zahlreiche Experimente diente, wurde eine Quantifizierung des Mengenunterschieds an PBP2x mittels Western-Blotanalysen mit ECL durchgeführt. Anhand von fünf unabhängigen Quantifizierungsexperimenten wurde für den Stamm C405 eine 6,3fach geringere PBP2x-Menge als im Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 nachgewiesen. Demnach besitzt der Laborstamm C405 nur ca. 84 % der normalen Menge des essentiellen PBP2x und in dem Laborstamm C606 ist die Menge sogar noch weiter reduziert. Diese Stämme weisen bei 30 °C und vor allem bei 37 °C im Vergleich zu R6 eine erhöhte Generationszeit auf. Da neben den PBP2x-Mutationen noch weitere Veränderungen in den Stämmen vorliegen, ist nicht klar, welche Mutationen mit diesem Phänotyp in Zusammenhang stehen. Möglicherweise liegt PBP2x im Wildtypstamm im Überschuss vor und wird nur in geringeren Mengen gebraucht, was wiederum eine Erklärung für die Lebensfähigkeit der Stämme C405 und C606 wäre.

Albarracin Orío *et al.*, 2011 konnten für Mosaik PBP1a und PBP2x in einer Tripel-PBP-Mutante eine längere Halbwertszeit ermitteln als im Wildtypstamm, was auf eine gesteigerte Stabilität zurückzuführen

ren ist. Es wäre denkbar, dass auch die veränderten PBP2x-Proteine aus den Laborstämmen C405 und C606 eine veränderte Halbwertszeit aufweisen, was sich wiederum auf das Wachstum und die Morphologie auswirken könnte.

4.2 PBP2x-Mutationen und ihre Folgen

Die Folgen der PBP2x-Mutationen wurden in Stämmen, die die Aminosäureaustausche im PBP2x aus C405 und C606 im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 beinhalten, eingehend untersucht. Dabei ging es um den Einfluß auf die PBP2x-Mengen, die β -Laktam-Resistenz und das Wachstumsverhalten. Mittels CD-Spektrometrie wurde zusätzlich überprüft, ob strukturelle Veränderungen detektierbar sind.

4.2.1 Auswirkungen auf die PBP2x-Mengen

Für die Stämme R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 konnte sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C eine im Vergleich zu dem Wildtypstamm R6 geringere PBP2x-Menge nachgewiesen werden. PBP2x ist ein Substrat der Serinprotease HtrA. Offenbar bewirken die PBP2x-Mutationen, die in C606 und C405 auftreten, eine veränderte enzymatische Aktivität, die sich in einer geringeren Affinität gegenüber Penicillin und Substratanalogen ausdrückt (Maurer *et al.*, 2008). Daraus folgt, dass sie einen Einfluß auf die Struktur von PBP2x haben müssen, die wiederum durch die Serinprotease HtrA erkannt werden und so zum teilweisen Abbau des Proteins führen. Die Serinprotease HtrA fungiert in Bakterien als bifunktionales Zellstressenzym, das sowohl Protease-, als auch Chaperonfunktion besitzt. Laut Literatur ist DegP aus *E. coli* in der Lage bei hohen Temperaturen als Protease und bei niedrigen als Chaperon zu fungieren (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Spiess *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002). In *S. pneumoniae* ist die Serinprotease HtrA jedoch sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C dazu in der Lage die veränderten PBP2x-Proteine im genetischen Hintergrund des Wildtyps abzubauen.

Bei weiteren Analysen der Daten zeigt sich für den Stamm R6_{pbp2xC606}-T6, der vier Veränderungen innerhalb der Transpeptidase-Domäne besitzt, eine im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T6 noch geringere PBP2x-Menge, die jedoch höher ist als in C405 und C606. Dies lässt sich durch die erhöhten *htrA*-Transkriptmengen (C405: 3,5fach; C606: 12,5fach; Peters, 2009) und somit einer größeren HtrA-Proteinmenge in diesen Stämmen erklären. Diese sind das Resultat der *ciaH306*- bzw. *ciaH305*-Allele, die das *cia*-Regulon und somit das dazugehörige HtrA-Gen aktivieren (*ciaH306*: 11-13fache Erhöhung, *ciaH305*: ca. 4fache Erhöhung; Müller *et al.*, 2011).

In Stämme, in denen sowohl das *ciaH305*-Allel (N95D), als auch die PBP2x-Veränderungen L403F und T536S im genetischen Hintergrund von R6 vorliegen, wurden ebenso große HtrA- und ebenso geringe PBP2x-Proteinmengen wie in C405 nachgewiesen. Durch dieses Ergebnis wird eine weitere, möglicherweise noch unbekannt Komponente, die für den Abbau des PBP2x aus C405 mit verantwortlich sein könnte, eindeutig ausgeschlossen.

Die Untersuchung der Auswirkung der Kombination der PBP2x-Veränderungen aus C606 mit dem *ciaH306*-Allel auf die PBP2x-Menge scheiterten an der bereits bekannten genetischen Instabilität des *ciaH306*-Allels (Giammarinaro *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2011), die zu zusätzlichen Missense-Mutationen in *ciaR* und *ciaH* führen. Interessanterweise zeigten zwei Stämme, die neben den vier AS-Austauschen und dem *ciaH306*-Allel zusätzlich den E255K-Austausch in der Histidinkinase CiaH im genetischen Hintergrund von R6 aufwiesen, identische PBP2x-Mengen wie R6. Bei der Mutation, die zu dem AS-Austausch E255K in CiaH führt, handelt es sich möglicherweise um eine kompensatorische Mutation, die die starke Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation, die auf das *ciaH306* zurückzuführen ist, anscheinend reprimiert. Um diese Hypothese endgültig zu bestätigen, sollte z.B. die Promoteraktivität von *htrA* in diesen Stämmen verglichen werden. Eine Reduktion der CiaRH-vermittelten Genexpression hatte wiederum in bereits untersuchten Fällen eine Erniedrigung der Resistenz gegenüber Cefotaxim, höhere Wachstumsraten und eine Wiederherstellung der Transformierbarkeit, zur Folge (Müller *et al.*, 2011).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Überexpression von *htrA* alleine für *S. pneumoniae* R6 schädlich ist (Kap. 4.4); wird dagegen das komplette CiaRH-System hochgefahren, wie in C405, mutieren die Zellen nicht. Möglicherweise ist hier die erhöhte Menge von HtrA notwendig, um das mutierte und möglicherweise auch enzymatisch nicht richtig funktionierende PBP2x zum Teil abzubauen.

4.2.2 Auswirkungen auf die β -Laktam-Resistenz

Die Auswirkungen der PBP2x-Veränderungen aus C405 und C606 auf die Cefotaxim-Resistenz wurden in den Stämmen *S. pneumoniae* R6_{p_{bp2x}C405}-T6 und R6_{p_{bp2x}C606}-T6 (Koch, 2006; Maurer *et al.*, 2008) sowohl bei 30°C, als auch bei 37°C untersucht. In diesen Stämmen konnte bereits bei beiden Temperaturen eine im Vergleich zu R6 verringerte PBP2x-Menge festgestellt werden. *S. pneumoniae* R6_{p_{bp2x}C606}-T6 weist bei 30 °C einen MHK-Wert für Cefotaxim von ca. 0,24 µg/ml auf und bestätigte damit den Größenbereich bereits bekannter Daten (Maurer *et al.*, 2008; Zerfaß, 2010). Bei 37 °C zeigte sich eine ca. 1,7fach erniedrigte MHK. Auch der Stamm R6_{p_{bp2x}C405}-T6 wies bei 30 °C eine MHK von ca. 0,15 µg/ml, was mit bereits bekannten Daten übereinstimmt (Maurer *et al.*, 2008) und wies, sobald eine Inkubation bei 37 °C erfolgte, eine leicht verringerte MHK auf. Demnach zeigen beide Stämme eine Temperatursensitivität. Ein Abbau von PBP2x wurde in diesen Stämmen zwar bei beiden Temperaturen nachgewiesen, jedoch nicht quantitativ verglichen. Temperatursensitivität erklärt sich aus einer Instabilität der Proteinstruktur, die durch bestimmte Mutationen bewirkt werden kann. Da HtrA solche missgefalteten Proteine erkennt, wird in diesen Mutanten PBP2x bei höherer Temperatur verstärkt abgebaut. Der Stamm R6_{p_{bp2x}C606}-T1, dem der G422D-Austausch in PBP2x aus C606 fehlt, besitzt eine noch deutlichere Temperatursensitivität hinsichtlich seiner MHK. Es wäre interessant, die einzelnen Mutationen von PBP2x-C606 und deren Auswirkung auf eine temperatursensitive Resistenz zu analysieren, und deren Kristallstruktur zu erhalten, um möglicherweise diesen Effekt auf einzelne

Mutationen zurückführen und in Zusammenhang mit der Struktur von PBP2x besser verstehen zu können.

Laut Krauß *et al.*, 1996 vermittelt der L403F-Austausch im PBP2x aus C405 ebenfalls eine verringerte Affinität gegenüber Cefotaxim bei 37 °C, was zu einer verringerten MHK bei 37 °C führt. Der L403F-Austausch ist der α -Helix 5 lokalisiert, wobei dieser in die hydrophobe Nische zeigt, die durch die $\alpha 4$, $\alpha 2$ und den Loop $\alpha 2$ - $\beta 2a$ stabilisiert wird. Diese drei α -Helixstrukturen befinden sich in der direkten Nähe zum katalytischen Zentrum, also an einer kritischen Position (Maurer *et al.*, 2008). Die Einführung dieser Veränderung führt zu einer drastischen Affinitätsminderung gegenüber Penicillin (Laible und Hakenbeck, 1991). Der Stamm R6_{pbp2xC405}-T5, der lediglich den AS-Austausch L403 in der Transpeptidase-Domäne des PBP2x beinhaltet, zeigt ebenfalls eine temperaturabhängige Resistenz (0,125 $\mu\text{g/ml}$ bei 30 °C und ca. 0,09 $\mu\text{g/ml}$ bei 37°C). Somit ist der L403F-Austausch offenbar ausschlaggebend für die geringere MHK bei 37°C.

Die Cefotaximresistenz in C405 ist hauptsächlich auf PBP2x zurückzuführen, während das *ciaH305*-Allel nur einen 1,5fachen Resistenzanstieg vermittelt (Müller *et al.*, 2011).

Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stamm C606 konnte eine temperaturabhängige MHK hier nicht nachgewiesen werden, obwohl diese beschrieben ist (Krauß *et al.*, 1996; Zerfaß, 2010). Dasselbe galt für zahlreiche weitere untersuchte C606-Klone. In den Genen *pbp2x*, *ciaR* und *ciaH* konnten keine Mutationen nachgewiesen werden; offenbar sind in den hier verwendeten Stämmen andere noch unbekannte kompensatorische Mutationen aufgetreten.

Die AS-Austausche in PBP2x aus C606 alleine vermitteln bei 30 °C ca. 20 % der Resistenz des hier untersuchten C606, bei 37 °C nur ca. 11,5 %. Das *ciaH306*-Allel, das das CiaRH-System aktiviert und als Resistenzdeterminante nachgewiesen wurde (Guenzi *et al.*, 1994) vermittelt alleine einen ca. 2fachen Resistenzanstieg gegenüber β -Laktamantibiotika (Guenzi *et al.*, 1994; Giammarinaro *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2011). Darüber hinaus hat C606 eine Mutation in *pbp2a* (Laible und Hakenbeck, 1987; Laible und Hakenbeck, 1991), die offenbar einen wesentlichen Beitrag für die Cefotaximresistenz dieser Mutante leistet (Sexauer, 2012).

4.2.3 Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie

Bei 30 °C zeigten sich für die Stämme R6_{pbp2xC606}-T1, R6_{pbp2xC606}-T6, R6_{pbp2xC405}-T5 und R6_{pbp2xC405}-T6 keine deutlichen Veränderungen im Wachstumsverhalten, da die Generationszeiten mit leichten Schwankungen denen von R6 entsprachen.

Lediglich der Stamm R6_{pbp2xC405}-T5 zeigte eine Auffälligkeit, da er eine deutlich geringere maximale Zelldichte erreichte als die anderen Stämme. Zusätzlich konnte anhand von vergleichenden, zellmorphologischen Analysen der Stämme C405, R6_{pbp2xC405}-T6 und R6 greifbare Unterschiede in der Länge der Zellen festgestellt werden. So wies der Stamm R6_{pbp2xC405}-T6, der die AS-Austausche L403F und T526S besitzt, im Vergleich zum R6-Stamm sowohl in der späten exponentiellen, als auch in der stationären Wachstumsphase eine deutlich verlängerte Zellmorphologie auf.

Die deutlich geringere Menge von PBP2x in R6_{pbp2xC405}-T6 geht mit der Verlängerung der Zellmorphologie einher. Dies lässt sich dadurch erklären, dass dadurch die septale Peptidoglykanbiosynthese gestört sein könnte, wohingegen die periphere Peptidoglykansynthese ohne Probleme fortläuft. Interessanterweise wies der Stamm R6_{pbp2xC405}-T5, der nur den L403F-Austausch im PBP2x besitzt, eine deutlich geringere maximale Zelldichte auf, als der Stamm R6_{pbp2xC405}-T6. Daher wirkt sich der T526S-Austausch möglicherweise leicht kompensatorisch auf das Wachstum aus.

Bei 30 °C wiesen die Laborstämme C405 und C606 ebenfalls eine etwas längere Generationzeit als R6 auf. Die Zellen von C405 sind im Vergleich zu R6 und vor allem zu R6_{pbp2xC405}-T6, kürzer und runder, was möglicherweise auf die geringeren PBP2x-Menge und/oder einer fehlerhaften Faltung zurückzuführen ist. Allerdings ist zu beachten, dass die Labormutante weitere unbekannte Veränderungen besitzen könnte, die sowohl einen Einfluß auf das Wachstum, als auch die Zellmorphologie haben könnten. Bei 37 °C besitzen die beiden Laborstämme C405 und C606 im Vergleich zu R6 neben längeren Generationszeiten auch eine verlängerte stationäre Phase. Auch die Stämme R6_{pbp2xC405}-T6, R6_{pbp2xC405}-T5, R6_{pbp2xC606}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T1 zeigen ein etwas langsames Wachstum als der Wildtypstamm R6; jedoch wachsen diese Stämme schneller als C405 bzw. C606. Die Daten belegen eindeutig, dass sich die PBP2x-Veränderungen aus C405 sich bei 30 °C deutlich negativer auf das Wachstum und die Zellmorphologie auswirken, als bei 37 °C. Dies korreliert mit der Temperatursensitivität der MHK.

4.2.4 Strukturelle Analysen mittels CD-Spektrometrie

Die Temperatursensitivität von PBP2x aus C405 und C606 ist offenbar das Resultat einer Destabilisierung der Proteinstruktur, die in den Mutationen begründet ist. Falsch gefaltete Proteine werden wiederum durch die Serinprotease HtrA erkannt und durch Abbau für die Zelle unschädlich gemacht. Um temperaturabhängige, strukturelle Unterschiede experimentell nachzuweisen wurden PBP2x der Mutanten C405, C606 und dem Parentalstamm R6 zunächst lösliche GST-Fusionsproteine in *E. coli* mittels Zirkulardichroismus-Spektrometrie bei 20 °C, 30 °C und 37 °C analysiert. Bei allen drei untersuchten Temperaturen wiesen die unterschiedlichen GST-PBP2x-Fusionsproteine jedoch nahezu vollkommen identische CD-Spektren auf, die charakteristisch für gefaltete, überwiegend α -helikale Proteine, sind. Offenbar sind die Veränderungen der PBP2x-Mutanten nicht groß genug, um sie mit dieser Methode nachweisen zu können, die vor allem für die Analyse kleine Proteine etabliert ist. Des Weiteren könnte auch die Anwesenheit der GST-Tags hinderlich gewesen sein. Innerhalb des Experiments gab es zudem Anzeichen dafür, dass die untersuchten Proteine zum Teil im aggregierten Zustand vorlagen, was die Analyse zusätzlich erschwerte. Letztendlich wäre es wünschenswert Kristallstrukturen von den Mutantenproteinen zu generieren.

4.3 Verringerte PBP2x-Menge, erhöhte PBP1a-Menge - eine mögliche Rolle der Serinprotease HtrA

Die im Kap. 3.1.4 gezeigten Ergebnisse belegen in dem Laborstamm C405 und all seinen Derivaten neben der bereits eingehend diskutierten geringeren PBP2x-Menge, eine ca. zweifach erhöhte PBP1a Menge. Das Resultat wurde mit Hilfe von Western-Blotexperimenten mit Zelllysaten der Stämme ermittelt, die zuvor bei 30 °C angezogen wurden. Der Stamm C405 und seine Derivate weisen, trotz ihrer geringeren PBP2x-Menge, im Gegensatz zu dem Stamm R6_{pbp2xC405}-T6, bei 30 °C eine normale Zellmorphologie auf. Daher wurde angenommen, dass die in R6_{pbp2xC405}-T6 beobachteten Wachstums- und zellmorphologischen Defekte (Kap. 4.2.3), die eindeutig auf die Veränderungen in PBP2x zurückgeführt werden konnten, durch weitere Veränderung in dem Stamm C405 kompensiert werden können. Die zweifach erhöhte PBP1a-Menge liefert dafür eine plausible Erklärung.

In den Zelllysaten von C405 und C606, die beide eine geringere PBP2x-Menge aufweisen, konnte PBP1a mit Hilfe des fluoreszierenden Penicillin V-Derivats (Zhao *et al.*, 1999) etwas stärker markiert werden, als im Wildtypstamm R6. Anhand dieses Experiments könnte auch für C606 eine leicht erhöhte PBP1a-Menge spekuliert werden, die vermutlich die gleiche kompensatorische Funktion erfüllt. Bei der Entwicklung der Resistenz in *S. pneumoniae*-Stämmen kommt dem PBP1a die Bedeutung einer sekundären Resistenzdeterminante zu. Falls die primären Resistenzdeterminanten PBP2x oder PBP2b verändert vorliegen, führen Veränderungen in PBP1a zu hohen Resistenzniveaus (Grebe und Hakenbeck, 1996; Muñoz *et al.*, 1992). Diese Daten deuten darauf hin, dass PBP2x und PBP1a in *S. pneumoniae* in der Lage sind miteinander zu interagieren. Auch Daten von Zerfaß *et al.*, 2009 liefern einen indirekten Beweis dafür, dass PBP2x und PBP1a miteinander interagieren. Es wird postuliert, dass Veränderungen in beiden PBPs innerhalb von resistenten klinischen Isolaten so entstanden sind, dass das Zusammenwirken der beiden Proteine sichergestellt wird (Zerfaß *et al.*, 2009).

Studien mittels Immunofluoreszenz belegen zudem, dass PBP2x und PBP1a, wie alle anderen PBPs in *S. pneumoniae* am Zellseptum lokalisieren (Morlot *et al.*, 2003; Zapun *et al.*, 2008). Diese Ergebnis wurde mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten sowohl für PBP2x, als auch für PBP1a in lebenden *S. pneumoniae* Zellen nachgewiesen (Sathlmann, 2011; Schweizer, 2011). Daher wird für diese beiden PBP-Proteinen angenommen, dass sie entscheidend an der septalen Peptidoglykansynthese und der Zellteilung beteiligt sind. PBP1a ist ein bifunktionales PBP, das sowohl Transpeptidase-, als auch Transglykosylase-Aktivität besitzt. Sham *et al.*, 2012 postulieren ein Model für das Wachstum von *S. pneumoniae*; in dem die Proteine PBP2x und PBP1a in einem Multienzymkomplex vorliegen und mit zahlreichen anderen Proteinen die Maschinerie für die septale Peptidoglykansynthese ausbilden. Die in C405 und seinen Derivaten detektierte, ca. 2fach erhöhte PBP1a-Menge könnte somit durch seine Aktivität den Mangel an PBP2x in diesen Zellen möglicherweise kompensieren. Dies würde auch die im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T6 normalere Zellmorphologie erklären.

Die verringerte PBP2x-Menge der Laborstämme C405 und C606 konnte auf den Abbau durch die Serinprotease HtrA zurückgeführt werden. In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob auch das PBP1a-Protein in den Stämmen C405 und C606 durch die Serinprotease HtrA bei 30 °C und bei 37 °C abgebaut wird. Die Ergebnisse zeigten zu den zuvor beschriebenen Daten einen deutlichen Widerspruch, da die PBP1a-Mengen in den Stämmen C405 und C606 nicht wie zuvor im Vergleich zu R6 erhöht, sondern sogar erniedrigt waren. Zusätzlich zeigten sich in den *htrA*-Deletionsstämmen KPKL6 und KPKL5 PBP1a-Mengen, die erneut mit der Menge in R6 vergleichbar waren. Diese Experimente deuten an, dass PBP1a, ebenso wie das jeweils veränderte PBP2x, in den Laborstämmen C405 durch die Serinprotease HtrA abgebaut, oder indirekt durch die Menge von funktionsfähigem PBP2x beeinflusst wird. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Western-Blotexperimenten bei 37 °C und einem Experiment bei 30 °C erhalten. Bei der Wiederholung dieses Experiments mit unabhängigen Zelllysaten bei 30 °C wurden dagegen in allen Stämmen gleiche Mengen an PBP1a detektiert. Die Widersprüchlichkeit der Daten zeigt deutlich an, dass weitere Experimente nötig sind, um den genauen Sachverhalt hinsichtlich der PBP1a-Menge in den Stämmen C405 und C606 zu klären. Eine Erklärung für die Daten wäre jedoch, dass HtrA tatsächlich in der Lage ist auch PBP1a abzubauen. Der Abbau der Proteine durch die Serinprotease HtrA kann vermutlich nur stattfinden, solange die Proteine noch nicht in einem Multienzymkomplex vorliegen. Sobald PBP2x dagegen in einem Komplex vorliegt, kann HtrA vermutlich nicht mehr zugreifen, da hydrophobe Regionen des Proteins räumlich nicht mehr zugänglich sind. Diese Theorie liefert somit auch eine plausible Erklärung, wieso PBP2x nur bis zu einem bestimmten Niveau durch die Serinprotease abgebaut werden kann. Andererseits wird der Serinprotease HtrA neben der Protease- auch eine Chaperonfunktion zugeschrieben und für die Ausbildung von Multienzymkomplexen werden weitere Hilfsproteine benötigt. Möglicherweise wirken sich auch die Aminosäureaustausche in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x, destabilisierend auf die Faltung und dadurch auch auf die Protein-Protein-Interaktionen aus.

4.4 Die Überexpression der Serinprotease HtrA ist ab einem bestimmten Level schädlich für *S. pneumoniae* - die Zelle wehrt sich

Das Gen *htrA*, das für die Serinprotease HtrA kodiert, wurde in den Stämmen R6, R6_{pbp2xC606}-T6 und R6_{pbp2xC405}-T6 mit Hilfe einer Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009; Kap. 2.7.3.2) zunächst deletiert. Anschließend wurden diese *htrA*-Deletionsstämme mit den unterschiedlich starken Promotoren P_{*htrA*}, P_{*vegM*} und P_{16S rRNA} vor *htrA* ektopisch komplementiert. Entsprechend wurden in den Stämmen steigende HtrA-Menge erwartet, und korrelierend dazu ebenfalls stufenweise verringerte PBP2x-Mengen. Die Erstellung der Deletionsderivate mittels Cheshire-Kassette und die anschließende Komplementation mit dem Konstrukt P_{*htrA*}-*htrA* gelang in allen drei genetischen Hintergründen ohne Probleme. Tatsächlich wirkte sich die Deletion von HtrA in den genetischen Hintergründen von R6_{pbp2xC606}-T6 und R6_{pbp2xC405}-T6 positiv auf die jeweilige PBP2x-Menge aus. In Komplementationsstämmen mit dem

Konstrukt P_{htrA} -*htrA*, das den nativen, mittelstarken *htrA*-Promotor beinhaltet, wurden die veränderten PBP2x-Proteine im gleichen Maße durch HtrA abgebaut, wie in den Ausgangsstämmen R6_{*pbp2x*C606}-T6 und R6_{*pbp2x*C405}-T6.

Der P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstamm, der den starken Promotor *vegM* vor *htrA* im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 beinhaltet, zeigte eine im Vergleich zu R6 leicht erhöhte HtrA-Menge. Dies beweist die erfolgreiche HtrA-Überexpression und die Funktionalität des Konstrukts. Allerdings wirkte sich diese Überexpression im R6 Hintergrund nicht auf die detektierte PBP2x-Menge aus. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das PBP2x-Protein essentiell ist und das PBP2x aus R6 keine Mutationen aufweist, die einen Abbau durch HtrA begünstigen könnten. Erstaunlicherweise war die Erstellung der P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämme im genetischen Hintergrund von R6 mit jeweils verändertem PBP2x aus C405 und C606 nicht möglich, ohne dass zusätzliche gravierende Mutationen in den Konstrukten vorkamen, genauso wie entsprechende Konstrukte mit dem sehr starken *16S rRNA*-Promotor vor *htrA*.

Die Positionen der identifizierten HtrA-Mutationen auf AS-Ebene wurden von mindestens fünf Transformanten pro genetischen Hintergrund untersucht. Zusätzlich wurde in drei ausgesuchten Transformanten die Auswirkungen der nachgewiesenen Veränderungen auf die HtrA- bzw. PBP2x-Mengen mittels Western-Blotanalysen analysiert. Interessanterweise wiederholten sich die Mutationen innerhalb der untersuchten Transformanten nicht. So konnten beispielsweise Mutationen identifiziert werden, die zu einem AS-Austausch innerhalb der Proteasedomäne von HtrA führen. Diese Stämme weisen aufgrund ihres stärkeren Promotors zwar eine deutliche Überexpression von HtrA auf, jedoch bleibt die PBP2x Menge unverändert. In den $P_{16S\ rRNA}$ -*htrA*-Komplementationsstämmen KPCL131 (G235S) und KPCL135 (N121D), die im genetischen Hintergrund von R6 erstellt wurden, konnte jeweils ein AS-Austausch innerhalb der Proteasedomäne identifiziert werden (Abb. 4.1).

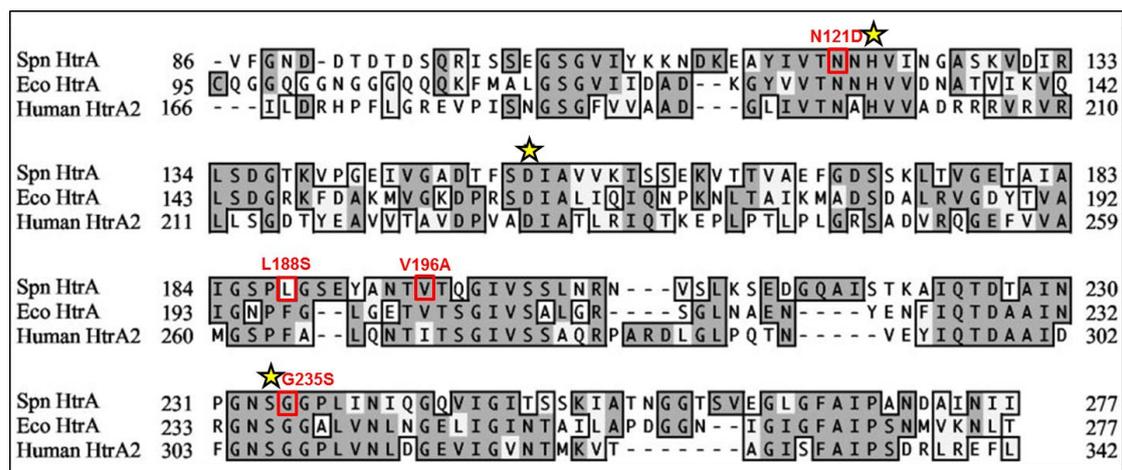


Abb. 4.1: Positionen der identifizierten Veränderungen innerhalb der Protease Domäne der Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae*, die die proteolytische Aktivität beeinträchtigen. Dargestellt ist ein Alignment der Protease Domäne der Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* (Spn HtrA), der aus *E. coli* HtrA/DegP (Eco HtrA) und der aus dem menschlichen HtrA2, das mittels ClustalW Algorithmus generiert wurde (modifiziert nach Sebert *et al.*, 2005). Gelbe Sterne markieren die Lage der AS der katalytischen Triade, die anhand der Kristallstruktur des *E. coli* DegP (Krojer *et al.*, 2002) und des menschlichen Proteins HtrA2 (Li *et al.*, 2002) definiert wird. Die identifizierten AS-Austausche sind innerhalb der Sequenz rot umrandet und angegeben.

G235S befindet sich direkt neben dem aktiven Serin der katalytischen Triade. Dagegen ist N121D in unmittelbarer Nähe zum Histidin der katalytischen Triade lokalisiert. Es kann spekuliert werden, dass diese die proteolytische Aktivität von HtrA beeinträchtigen, in Übereinstimmung mit den unveränderten PBP2x-Mengen in diesen Stämmen. In den P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen KPKL421 (V196A) und KPKL423 (L188S), die im genetischen Hintergrund von $R6_{pbp2x}C606$ -T6 erstellt wurden, sind ebenfalls Veränderungen innerhalb der Proteasedomäne nachgewiesen worden (Abb. 4.1). Diese Stämme zeichneten sich durch eine erfolgreiche Überexpression des HtrA-Proteins und dennoch unveränderten Mengen des mutierten C606-PBP2x aus. Deshalb kann auch hier davon ausgegangen werden, dass diese AS-Austausche die Protease-Aktivität inhibieren.

Daneben wurden weitere Mutationen identifiziert, die die Überexpression bzw. vollständige Proteinsynthese von HtrA inhibierten. In den P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstämmen KPKL321 und KPKL325, die im genetischen Hintergrund von $R6_{pbp2x}C405$ -T6 erstellt wurden, konnte auf dem Western-Blot kein HtrA detektiert werden. Die Sequenzierungsergebnisse belegten Mutationen, die zu zahlreichen AS-Veränderungen und einem vorzeitigen Stopp der Proteinsynthese führen. Ein weiteres interessantes Resultat lieferte der P_{vegM} -*htrA*-Komplementationsstamm KPKL322, der aufgrund von zwei Mutationen, mehrere AS-Veränderungen innerhalb der Protease-, der PDZ-Domäne und einen zusätzlichen Synthesestopp nach AS 296 aufweist. Bei diesem Stamm wurde ein kleineres HtrA-Protein detektiert, das offenbar trotz dieser Vielzahl an Mutationen in der Lage war PBP2x aus C405 abzubauen.

Die Ergebnisse dieser umfassenden Komplementationsstudien zeigen eindeutig, dass die Serinprotease HtrA je nach genetischem Hintergrund nur bis zu einem bestimmten Level bzw. überhaupt nicht überexprimiert werden kann. In dem Wildtypstamm konnte eine leichte Überexpression der Serinprotease HtrA mit Hilfe des mittelstarken *vegM*-Promotors realisiert werden. Dagegen führte die Komplementation in Stämmen mit jeweils verändertem PBP2x aus C405 und C606 zu zusätzlichen gravierenden HtrA Mutationen. Die Zellen der Stämme mit verändertem PBP2x, das nachweislich durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird, tolerieren demnach die Überexpression von HtrA noch weniger als der Wildtypstamm R6. Dies liegt möglicherweise daran, dass das mutierte PBP2x stärker von HtrA angegriffen wird und dann nicht mehr in ausreichender Menge für die Zelle zur Verfügung steht. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Serinprotease, neben PBP2x sicherlich auch weitere Angriffsziele besitzt, deren Abbau möglicherweise ebenfalls schwerwiegende Folgen für die Zelle mit sich bringt.

4.5 Charakterisierung von HtrA in *S. pneumoniae*

4.5.1 Wann ist HtrA temperatursensitiv?

HtrA-Proteine sind für die Proteinqualitätskontrolle von entscheidender Bedeutung, da sie sowohl Protease-, als auch Chaperonfunktion besitzen, wobei sie laut Literatur bei niedrigeren Temperaturen als Chaperon und bei höheren Temperaturen eher als Protease fungieren (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Spiess *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002). In zahlreichen Organismen verringert die Deletion von HtrA daher unter anderem die Sensitivität gegenüber Temperaturstress. So erwiesen sich DegP-Deletionsmutanten in *E. coli* als temperatursensitiv (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1989). Laut Strauch und Beckwith, 1988 sind diese Stämme zusätzlich nicht in der Lage bei höheren Temperaturen falsch gefaltete, periplasmatische Proteine abzubauen. Auch die Inaktivierung der extrazellulären Protease HtrA_{Li} aus *Lactococcus lactis* ging mit einer Temperatursensitivität der Stämme während des Wachstums bei hohen Temperaturen einher, d.h. HtrA_{Li} ist bei Temperaturen über 37 °C essentiell (Poquet *et al.*, 2000).

Innerhalb dieser Arbeit wurde anhand von Temperaturshiftexperimenten und zellmorphologischen Untersuchungen analysiert unter welchen Bedingungen die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* sich als temperatursensitiv erwies. Des Weiteren wurde ermittelt wie gut Stämme mit verändertem PBP2x in An- und Abwesenheit der Serinprotease HtrA in der Lage waren Hitzestress zu tolerieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass in dem Wildtypstamm R6 die Serinprotease HtrA nicht temperatursensitiv ist. Durch das Fehlen der Serinprotease HtrA bzw. der Proteaseaktivität von HtrA wurde weder das Wachstum, noch die Zellmorphologie bei allen untersuchten Temperaturen (30 °C, 37 °C und 41 °C) negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse korrelieren zum Teil mit den Daten einer Diplomarbeit von Groh, 2002. Die dort untersuchte *htrA*-Insertions-Duplikationsmutante in *S. pneumoniae* R6 zeigte ebenfalls keine Temperatursensitivität hinsichtlich des Wachstums. Allerdings wies die *htrA*-Insertions-Duplikationsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Morphologie auf. Die Daten sind allerdings nicht direkt miteinander vergleichbar, da die Experimente von Groh, 2002 nicht in C-Medium, sondern in THB-Medium durchgeführt wurden.

Bei den Stämmen R6_{pbp2xC606}-T6 und R6_{pbp2xC405}-T6 (PBP2x von C405 und C606 im genetischen Hintergrund von R6) wirkte sich die Deletion von *htrA* bei allen drei untersuchten Temperaturen positiv auf die Zellmorphologie aus. Die Stämme besitzen aufgrund ihres jeweils mutierten PBP2x-Proteins, das in verringerter Menge vorliegt, vor der Deletion der Serinprotease HtrA und vor allem bei 30°C eine deutlich längere Zellmorphologie. Dabei ist dieser Effekt bei dem Stamm R6_{pbp2xC606}-T6 im Vergleich zu R6_{pbp2xC405}-T6 wesentlich stärker ausgeprägt. Offenbar führen die vier PBP2x-Mutationen aus C606 zu einer größeren Strukturänderung und dadurch zu einem stärkeren Abbau durch HtrA, was das septale Wachstum stärker beeinträchtigt und in einer noch längeren Zellform resultiert. Sobald eine Inkubation bei 41 °C erfolgt, zeigen die Stämme R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 veränderte

Zellen mit runder, geschwollener Form. Bemerkenswerterweise führt die Deletion der Serinprotease HtrA zwar bei einer Inkubation bei 41 °C zu einer Normalisierung der Zellmorphologie, jedoch wachsen beide *htrA*-Deletionsstämme bei dieser Temperatur deutlich schlechter als ihr jeweiliger Ausgangsstamm, wobei R6_{*pbp2x*C606}-T6 einen stärkeren Effekt aufwies. Dies ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass die Serinprotease HtrA in den Stämmen mit verändertem PBP2x bei Hitzestress benötigt wird, um durch den Abbau von falsch gefalteten Proteinen ein besseres Wachstum zu ermöglichen.

In einer Studie von Jones *et al.*, 2001 wurde für HtrA aus *S. pyogenes* eine essentielle Rolle für das Überleben bei oxidativen- und bei Hitzestress postuliert. Drei Jahre später veröffentlichten Lyon und Caparon eine Arbeit, in der das Gen *htrA* in *S. pyogenes* durch unterschiedliche Methoden deletiert und die Auswirkungen hinsichtlich der Hitzestresstoleranz untersucht wurden (Lyon und Caparon, 2004). Diese Autoren wiesen nach, dass sich der temperatursensitive Phänotyp auf polare Effekte der *htrA*-Deletionen zurückführen ließ, d.h. stromabwärts gelegene Gene für diesen Phänotyp verantwortlich waren.

Die *htrA*-Deletion, die in der vorliegenden Arbeit in R6 und *pbp2x*-Mutanten dargestellt wurden, wurden mit Hilfe der Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009) konstruiert. Bei der Verwendung dieser temporären, sich selbst deletierenden Erythromycin-Resistenzkassette, bleibt nach erfolgter Deletion des Gens, lediglich eine kleine Narbe im Genom zurück. Dadurch wurden Effekte auf stromabwärts liegende Gene (in diesem Fall *parB*) vermieden. Somit kann behauptet werden, dass alle zuvor ermittelten Daten prinzipiell direkt auf die Deletion der Serinprotease HtrA zurückzuführen sind. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Aktivitäten der CiaR abhängigen Promotoren in Abwesenheit von HtrA erhöht sind (Müller, 2011).

Eine mögliche Temperatursensitivität der Serinprotease HtrA wurde auch in den Laborstämmen C405 und C606 analysiert, wobei *htrA*-Deletionsstämme verwendet wurden, bei denen *htrA* durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Um Aussagen über die Chaperonfunktion von HtrA treffen zu können, wurden zusätzlich *htrA*_{S234A}-Komplementationsstämme untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche lieferten für HtrA im Laborstamm C606 keine eindeutigen Hinweise auf eine Temperatursensitivität. Dagegen zeigt sich für HtrA im genetischen Hintergrund von C405 eine Temperatursensitivität, da der Temperaturshift auf 41 °C zu einer deutlichen Änderung des Wachstumsverhaltens und ebenfalls zu einer stark deformierten Morphologie in allen drei Stämmen führte. Der Laborstamm C405, der eine intakte Serinprotease besitzt, wies die beste Anpassung an das Wachstum bei 41 °C auf, wohingegen der *htrA*-Deletionsstamm den größten Wachstumsdefekt zeigte. Diesem Stamm fehlt sowohl die Chaperon-, als auch Proteasefunktion von HtrA. Falsch gefaltete und degradierte Proteine können daher nicht abgebaut werden. Zusätzlich werden die Proteine auch nicht geschützt, da die Chaperonfunktion von HtrA ebenfalls fehlt. Der *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm zeigte einen deutlich schwächer ausgeprägten Wachstumsdefekt bei 41 °C als in dem *htrA*-Deletionsstamm. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass sich die Chaperonfunktion positiv auf das Wachstum bei 41 °C

auswirkt. Da die beiden *htrA*-Deletionsstämme in C405 und C606 jedoch mit Hilfe einer Kanamycin-Kassette erstellt wurden, können polare Effekte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.5.2 Einfluss von HtrA auf die PBP2x-vermittelte Cefotaxim-Resistenz

In der Literatur finden sich einige Hinweise, die Proteasen eine Bedeutung bei der Antibiotikaresistenz in Bakterien zuschreiben. In dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* sind die ATP-abhängigen Proteasen Lon und AsrA beispielsweise nachweislich an der Antibiotikaresistenz gegen Ciprofloxacin bzw. Tobramycin beteiligt (Brazas *et al.*, 2007; Breidenstein *et al.*, 2008; Kindrachuk *et al.*, 2011). Für den bekapselten Stamm *S. pneumoniae* D39 wurde durch eine induzierte Überexpression des Proteins ClpL (caseinolytic protease) nachgewiesen, dass dies zu einer gesteigerten Menge an PBP2x und letztendlich zur Penicillin-Resistenzhöhung führt (Tran *et al.*, 2011). Tran *et al.*, 2011 erklären diese Wirkung dadurch, dass ClpL die Expression von *pbp2x* stabilisieren und mit PBP2x nach einem Hitzeschock interagieren kann und dadurch die Translokation von PBP2x unterstützt. ClpL ist die ATP-bindende Untereinheit einer ATP-abhängigen Protease und laut Bjørnstad und Håvarstein, (2011) eher für die Faltung als für die Degradierung von Proteinen zuständig. Laut Literatur wird vermutet, dass die Menge an mutiertem PBP-Protein auch ausschlaggebend für die Resistenz sein kann, da dann ebenfalls mehr β -Laktamantibiotika für die Inhibierung des Wachstums benötigt wird (Fontana *et al.*, 1983; Giles und Reynolds, 1979).

Innerhalb dieser Arbeit wurde für die Laborstämme C405 und C606, aber auch für die Stämme R6_{*pbp2xC405*}-T6 und R6_{*pbp2xC606*}-T6, eine jeweils verringerte PBP2x-Menge nachgewiesen, die wiederum auf den Abbau durch die Serinprotease HtrA zurückgeführt werden konnte. Weder die *htrA*-Deletion, noch die Komplementation mit einer Protease-inaktiven Form von *htrA* im genetischen Hintergrund des Wildtypstamms R6 wirkte sich bei den beiden Temperaturen auf die Cefotaxim-Resistenz aus. Die Protease- als auch die Chaperonfunktion von HtrA ist also hier für die Cefotaxim-Resistenz nicht von Bedeutung. Allerdings ließen sich sehr geringe Unterschiede der Cefotaxim-Resistenz (von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,025 $\mu\text{g/ml}$) in einer vorhergehenden Arbeit in einer *htrA*-Mutanten von R6 bei 37 °C feststellen. Dies wurde jedoch nicht als signifikanter Effekt gewertet (Müller, 2011).

Die Deletion von *htrA* in C405 führte zu einem deutlichen Resistenzanstieg vor allem bei 37 °C. Die ermittelte Resistenz des *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms liegt bei 30 °C, noch deutlicher bei 37 °C, über der MHK des Laborstamms, jedoch leicht unterhalb der des *htrA*-Deletionsstamms. Eine mögliche Erklärung für die leichte Resistenzhöhung in dem *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamm, der proteolytisch-inaktiv sein sollte, liefern die Ergebnisse der durchgeführten β -Casein Studien. Dabei zeigte sich eindeutig, dass auch die vermeintlich Protease-inaktive Form von HtrA in der Lage war geringe Mengen an β -Casein abzubauen. Dieser Befund belegt, dass durch die S234A-Mutation die Proteaseaktivität nicht komplett gehemmt wird. Die verbleibende Restaktivität könnte somit geringe Menge des mutierten PBP2x abbauen. Dies würde die im Vergleich zu C405 leicht erhöhte Resistenz des *htrA*_{S234A}-Komplementationsstamms erklären.

Der Effekt von HtrA auf die β -Laktam-Resistenz wurde auch in Stämmen mit definiertem genetischem Hintergrund mit jeweils verändertem PBP2x aus C405 und C606 untersucht. Dabei belegen die Ergebnisse, dass sich das Fehlen der Serinprotease HtrA in den Stämmen mit jeweils verändertem PBP2x bei 37 °C positiv auf die Cefotaxim-Resistenz auswirken, was wiederum durch die erhöhten Mengen des jeweils veränderten PBP2x zu erklären ist. Der von HtrA ausgehende Effekt war dabei in dem Stamm, der das PBP2x aus C606 beinhaltet größer, als in dem Stamm mit dem veränderten PBP2x aus C405.

Für die Stämme R6_{pbp2xC405}-T6 und R6_{pbp2xC606}-T6 wurde zuvor bereits eine Temperatursensitivität hinsichtlich ihrer Cefotaxim-Resistenz beschrieben, da beide bei 37 °C eine geringere MHK aufweisen, als bei 30 °C. Interessanterweise konnte bei 30 °C, sobald die Serinprotease HtrA fehlte, eine unterschiedliche Auswirkung auf die Resistenz beobachtet werden. In dem Stamm mit PBP2x aus C606 wurde hier ebenfalls ein leichter Resistenzanstieg beobachtet. Der *htrA*-Deletionsstamm mit PBP2x aus C405 wies bei 30 °C dagegen eine verringerte MHK auf. Dieser Phänotyp lässt sich offenbar nicht auf die erhöhte PBP2x-Menge zurückführen, die durch die *htrA*-Deletion in beiden Fällen beobachtet wurde, sondern muss mit den unterschiedlichen Mutationen in PBP2x zusammenhängen. Möglich ist auch, dass andere CiaR-regulierte Gene dabei eine Rolle spielen, da die Aktivitäten der CiaR abhängigen Promotoren nachweislich erhöht sind, sobald die Serinprotease HtrA fehlt (Müller, 2011). Sobald sich die Gene der kleinen regulatorischen csRNAs: *ccnD* und *ccnE* alleine im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 mit dem *ciaH202*-Allel befanden, wurde eine stark erhöhte Cefotaxim-Resistenz beobachtet (A. Schnorpfeil, persönliche Mitteilung).

4.6 Lokalisationsstudien mit den Fusionsproteinen GFP-PBP2x und dem niederaffinen GFP-PBP2x_{C405}

Für ein N-terminales GFP-PBP2x-Fusionsprotein wurde eine septale, von Zellzyklus abhängige, Lokalisation in lebenden Zellen nachgewiesen (Stahlmann, 2011). Lokalisationsstudien mit dem niederaffinen GFP-PBP2x_{C405} im genetischen Hintergrund von C405 und R6_{pbp2xC405}-T6 belegen, dass dieses Fusionsprotein in beiden Fällen durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird, was wiederum in einem größeren Anteil an zytoplasmatisch leuchtenden Zellen resultiert. Im genetischen Hintergrund des Laborstamms C405 wurde mit ca. 80 %, der größte Anteil an grün leuchtenden Zellen nachgewiesen. Dies lässt sich durch das *ciaH305*-Allel und die dadurch erhöhte Menge an HtrA erklären. Im genetischen Hintergrund von R6_{pbp2xC405}-T6 wurde ebenfalls ein erhöhter Anteil an zytoplasmatisch leuchtenden Zellen beobachtet, der jedoch vergleichsweise geringer ausfiel. Western-Blotexperimente mit GFP-Antikörpern zeigten, dass diese zytoplasmatische Lokalisation auf die Anwesenheit eines der vier nachgewiesenen Abbauprodukte zurückgeführt werden kann. Das kleinste, das der Größe von GFP entspricht, liegt im Zytoplasma vor.

Das native *pbp2x* aus C405 wurde in den Stämmen deletiert, um eine mögliche Konkurrenz zwischen dem PBP2x aus C405 und dem Fusionprotein GFP-PBP2_xC405 zu verhindern. In dem Fall wiesen etwas mehr Zellen eine septale Lokalisation auf (KPKL71; KPKL81).

Durch die *htrA*-Deletion in diesen GFP-PBP2_x-Stämmen wurde der Abbau der GFP-PBP2_xC405-Proteine durch die Serinprotease HtrA eindeutig belegt, da die Menge an Abbauprodukten in Western-Blotanalysen deutlich reduziert vorlag. Zusätzlich zeigten sich bei der statistischen Auswertung der Fluoreszenzsignale deutliche Unterschiede. So konnten in dem *htrA*-Deletionsstämmen, im Vergleich zu den Parentalstämmen, ein deutlich größerer Anteil der Zellen mit septaler Lokalisation nachgewiesen werden. Zusätzlich sank auch der jeweilige Anteil an Zellen, die komplett leuchteten. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass nach der Deletion der Serinprotease HtrA in den unterschiedlichen Stämmen mit GFP-PBP2_xC405-Fusionsprotein, dieses deutlich weniger abgebaut wird und das zytoplasmatische Leuchten zum Teil verschwindet und der Anteil an Zellen, die eine septale Lokalisation von GFP-PBP2_xC405 aufweisen, ansteigt. Mit Hilfe dieser Experimente konnte demnach bewiesen werden, dass sich das veränderte niederaffine GFP-PBP2_xC405, sobald es durch die Serinprotease HtrA nicht abgebaut wird, sich ebenfalls an der Stelle befindet, an der es am dringenden benötigt wird - dem Zellseptum.

Interessanterweise wurden in dem Stamm DKL031, der im induzierten Zustand lediglich das Fusionsprotein GFP-PBP2_x besitzt, mittels Western-Blotanalysen mit α -GFP Antikörpern ebenfalls deutliche Abbauprodukte (ca. 26 kDa, ca. 35 kDa und ca. 60 kDa) nachgewiesen. Das ist insofern bemerkenswert, da dieser Stamm das Wildtyp PBP2_x besitzt. Tatsächlich läßt sich nach Deletion von *htrA* nur noch das Abbauprodukt von ca. 60 kDa nachweisen. Man kann spekulieren, dass neben der Serinprotease HtrA noch eine weitere, unbekannte Komponente beteiligt ist, die zu dem 60 kDa-Produkt führt. Lokalisationsstudien des *htrA*-Deletionsstamms belegen, dass die Zellen neben dem bereits bekannten septalen Lokalisationsprofilen ein zusätzliches Profil aufweisen. So konnte in 18,5 % der untersuchten Zellen, unabhängig von ihrem Zellteilungsstadium, das Fluoreszenzsignal von GFP-PBP2_x ausschließlich in der Membran lokalisiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Deletion der Serinprotease HtrA auch in diesem Stamm eindeutig auf die Lokalisation des GFP-PBP2_x-Fusionsproteins auswirkt.

Die Lokalisation der Serinprotease HtrA wurde in dem Stamm *S. pneumoniae* D39 während des Zellzyklus bereits untersucht (Tsui *et al.*, 2011). Hierfür wurde das Protein HtrA mit einem L-FLAG³-Tag versehen und die Lokalisation mittels Immunofluoreszenz ermittelt. Die von Tsui *et al.*, 2011 ermittelten Ergebnisse sind der Abb. 4.2 A zu entnehmen.

Die Serinprotease HtrA ist während der Zellteilung am Zellseptum oder Äquator lokalisiert, also an den Stellen in der Zelle an denen die Peptidoglykanbiosynthese und die Zellteilung stattfinden (Sham *et al.*, 2012). Bemerkenswerterweise stimmt die von Tsui *et al.*, 2011 mittels Immunofluoreszenz ermittelte Lokalisation von HtrA mit der in dieser Arbeit ermittelten Lokalisation des GFP-PBP2_x-Proteins während des Zellzyklus nahezu komplett überein (siehe Abb. 4.2 B).

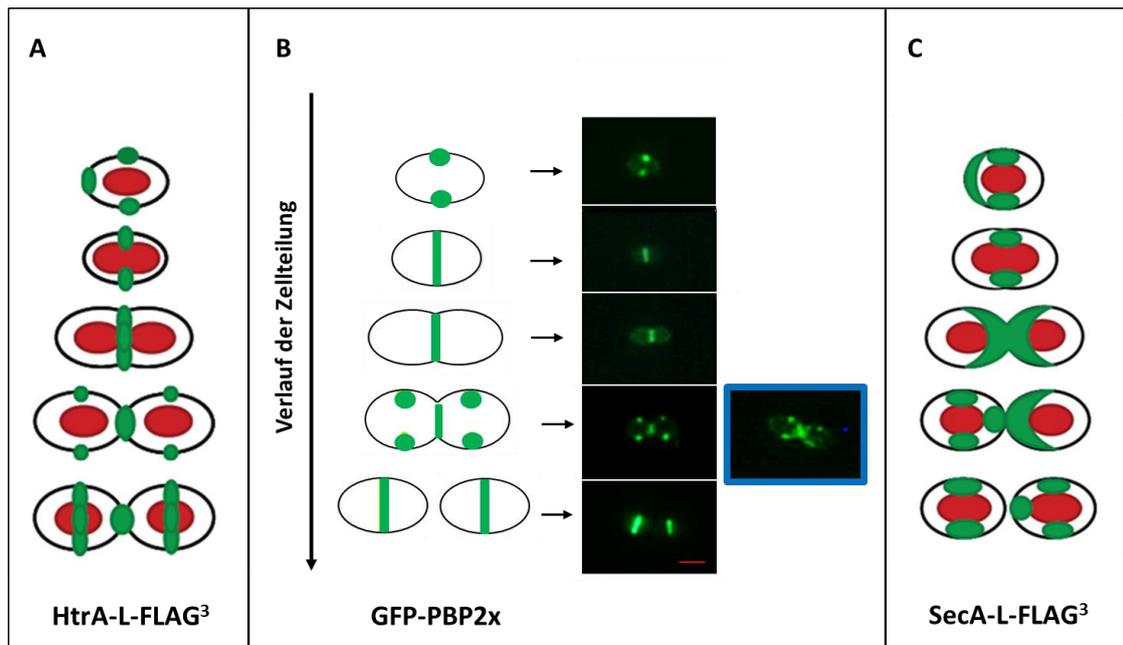


Abb. 4.2: Lokalisationsmuster der Serinprotease HtrA und der SecA-Untereinheit der Sec-Translokase in *S. pneumoniae* D39 (modifiziert nach Tsui *et al.*, 2011) und GFP-PBP2x in *S. pneumoniae* R6 im Verlauf des Zellteilungszyklus. **A** und **B**: In grün sind die Lokalisationsmuster von HtrA-L-FLAG³ (**A**) und SecA-L-FLAG³ (**C**) dargestellt. Die *S. pneumoniae* D39 Zellen wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase wachsen gelassen, fixiert und anschließend mittels Immunofluoreszenz untersucht. In roter Farbe ist das Ergebnis der DAPI Färbung gezeigt und in grün sind die ermittelten Lokalisationen der mittels L-FLAG³ markierten Proteine zu sehen. **B**: Die Lokalisation von GFP-PBP2x wurde in lebenden *S. pneumoniae* R6 Zellen während der Zellteilung untersucht. Rechts ist die Lokalisation schematisch dargestellt. Links sind Aufnahmen der Fluoreszenzdetektion von GFP-PBP2x dargestellt, die in dieser Arbeit dokumentiert wurden. Maßstab: 1 µm dar. Die einzelnen Reihen von Bildern sind durch Pfeile verschiedenen Schemata zugeordnet.

Tsui *et al.*, 2011 postulieren weiterhin, dass HtrA für die Qualitätskontrolle von Proteinen zuständig ist, die durch die Sec-Translokase exportiert werden. Der Sec-Translokase-Pathway stellt den Haupttransportweg dar; der sowohl den Transport über, als auch in die zytoplasmatische Membran von Bakterien realisiert (Sham *et al.*, 2012). Tsui *et al.*, 2011 ermittelten die Lokalisation der Proteine SecA und SecY der Sec-Translokase in *S. pneumoniae* D39 mittels Immunofluoreszenzmikroskopie. Durch diese Experimente konnte für SecA nachgewiesen werden, dass sich dieses Protein in exponentiell wachsenden Zellen in erster Linie an den äquatorialen Zonen, den Septen und den Hemisphären lokalisierte (siehe Abb. 4.2 C). Bei ca. 75 % der Zellen zeigte sich eine X-förmige Verteilung des SecA-Proteins. Solch eine X-förmige Verteilung konnte im Rahmen dieser Arbeit auch bei Lokalisationsstudien mit dem GFP-PBP2x in einigen *S. pneumoniae* Stämmen, in denen die Serinprotease HtrA deletiert wurde, beobachtet werden. Ein Beispiel für solch eine Lokalisation ist in der Abb. 4.2 B im blauen Kasten dargestellt. Diese Befunde bestärken die Hypothese, dass das ungefaltete PBP2x-Protein durch die Sec-Translokase exportiert und anschließend in die Membran integriert wird. Die Serinprotease HtrA führt dabei die Proteinqualitätskontrolle durch und baut falsch gefaltete Proteine, oder Proteine, die sich nicht im Komplex befinden, ab.

4.7 Auswirkungen der Depletion der Fusionsproteine GFP-PBP2x und GFP-PBP2x_{C405} und der Einfluss der Serinprotease HtrA

Die Rolle des essentiellen PBP2x aus *S. pneumoniae* R6 und C405 bei der Zellteilung wurde anhand von umfangreichen Depletionsstudien näher untersucht. Dafür wurden das Wachstum und die Zellmorphologie von Stämmen analysiert, die lediglich ein konditionales ektopisches *gfp-pbp2x* aus R6 bzw. *gfp-pbp2x* aus C405 beinhalten, das unter der Kontrolle des zinkinduzierbaren Systems steht. Innerhalb dieser Experimente wurde die ZnCl₂-Konzentration durch Auswaschen verringert und dadurch die Transkription der jeweiligen *gfp-pbp2x* Fusion gestoppt.

Die kontinuierliche Dezimierung des GFP-PBP2x bzw. GFP-PBP2x_{C405} wirkte sich in allen drei konditionalen Stämmen DKL031, KPKL711 und KPKL811 negativ auf das Wachstum und die Zellmorphologie aus. So waren die Stämme in der Lage mehrere Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, da sich innerhalb der Zelle noch ausreichend synthetisiertes Fusionsprotein aus der Vorkultur befand, bevor sich ein Wachstumsstopp einstellte. Innerhalb der Depletionsexperimente verschlechterte sich die Zellmorphologie in allen untersuchten konditionalen Stämmen zunehmend. Die Zellen wiesen zunächst eine stark verlängerte Zellmorphologie auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die septale Peptidoglykansynthese durch den Mangel an dem jeweiligen GFP-PBP2x gestört war, wohingegen die periphere Peptidoglykansynthese weiter verlief und in der starken Elongation der Zellen resultierte. Sobald den Zellen das funktionsfähige Fusionsprotein komplett fehlte, konnte die Quervernetzung der Peptidoglykanstränge am Zellseptum, welche durch essentielles PBP2x katalysiert wird, gar nicht mehr stattfinden. Dies führte zu einer Destabilisierung der Zellwand und zur Bildung von Läsionen. Durch diese konnte wiederum Wasser einströmen, was das Aufblähen der Zellen erklärt. Letztendlich konnte die Zellwand dem Turgor nicht mehr standhalten und die Zellen platzten. Durch diese Ergebnisreihe konnte verifiziert werden, dass es sich bei PBP2x aus *S. pneumoniae*, wie von Kell *et al.*, 1993 postuliert, um ein essentielles Protein handelt.

In den konditionalen Stämmen variierte sowohl die Anzahl an Generationen, die diese in der Lage waren ohne Induktor zu wachsen, als auch der Zeitpunkt an dem eine veränderte Zellmorphologie beobachtet wurde, in Abhängigkeit von der PBP2x-Menge:

Abnehmende PBP2x-Menge:

Genetischer Hintergrund:	R6	R6 _{<i>pbp2x</i>C405} -T6	C405
	DKL031	> KPKL81	> KPKL71

Der Stamm KPKL71 enthält das *ciaH305*-Allel, das zu einer moderaten, ca. 4fache Erhöhung der Aktivierung CiaR-abhängiger Promotoren, also auch *htrA*, im Vergleich zum Wildtyp führt (Müller *et al.*, 2011), und besitzt daher die geringste Menge an PBP2x. Dies macht sich in den Depletionsstudien dadurch bemerkbar, dass der Stamm KPKL71 im Vergleich zu dem Stamm KPKL81 eine geringere Anzahl an Generationen in Abwesenheit des Induktors wachsen kann, bevor sich ein Wachs

tumsstopp einstellt. Die Anzahl an möglichen Generationen, die die untersuchten Stämme innerhalb der Depletionsstudien wachsen konnten, korreliert somit mit den Mengen der jeweiligen GFP-PBP2x-Fusionsproteine, die zu Beginn der Experimente in den Vorkulturen mit ZnCl_2 vorlagen.

Pereira *et al.*, 2007 führten ähnliche Depletionsexperimente mit einer konditionalen Mutante des monofunktionalen hmw PBP1 aus *Staphylococcus aureus*, einem PBP2x-Homolog, durch. Hierfür wurde die Transkription des Gens *pbpA* unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors gestellt. Sobald diese konditionale Mutante in IPTG-freies Medium überimpft wurde, war ein 4-5facher Anstieg in der Zellmasse zu erkennen, der jedoch nicht mit dem proportionalen Anstieg in der Lebendkeimzahl einherging (Pereira *et al.*, 2007). Die Zellen waren nicht mehr in der Lage sich zu teilen, vergrößerten sich jedoch, was mit einem schnellen Verlust der Lebensfähigkeit einher ging (Pereira *et al.*, 2009). PBP1 in *Staphylococcus aureus* ist also für das Wachstum und das Überleben der Zellen essentiell. Eben diese Tatsache konnte auch anhand der hier durchgeführten Depletionsexperimente mit GFP-PBP2x bzw. GFP-PBP2_xC₄₀₅ für das PBP2x aus *S. pneumoniae* bewiesen werden.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen und der Wachstumsstopp, der durch die PBP2x-Depletion induziert wurden, waren reversibel, sobald die Synthese des Fusionsproteins durch die Zugabe von 0,15 mM ZnCl_2 wieder induziert wurde. Nach 1,5-3 h setzte das Wachstum wieder ein und die Zellmorphologie zeigte ebenfalls eine deutliche Erholung, wobei eine komplette Erholung jedoch auch nach vier Generationen in Anwesenheit des Induktors nicht beobachtet wurde. Dies korreliert in etwa mit der Studie von Pereira *et al.*, 2009, in der unter anderem das Wachstum und die Lebensfähigkeit des *Staphylococcus aureus* Stamms COLPBP1TPase⁻ untersucht wurde. In diesem Stamm ist die Transpeptidase-Domäne in PBP1 inaktiviert; zusätzlich besitzt dieser Stamm eine chromosomale *pbp1*-Kopie, die wiederum unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors steht (Pereira *et al.*, 2009). Abwesenheit des Induktors IPTG führte zum Wachstumsstopp und Zelllyse. Erst fünf Generationen nach Zugabe von IPTG wies dieser Stamm eine Kompensation der Autolyse der Zellen auf. Die Zellmorphologie zeigte dagegen erst nach zehn Stunden in Anwesenheit des Induktors Anzeichen einer Normalisierung (Pereira *et al.*, 2009).

Innerhalb von umfassenden, vergleichenden Depletionsstudien wurde die Auswirkung des Fehlens der Serinprotease HtrA auf die Zellmorphologie und auf das Wachstum untersucht. In Abb. 4.3 ist das Wachstumsverhalten der Stämme KPKL71, KPKL711 und des Ausgangstamms C405 während des durchgeführten Depletionsexperiments zusammengefasst dargestellt. Die HtrA-Deletion führt zu einer eindeutigen Verbesserung des Wachstums. Die KPKL711 Zellen können aufgrund der im Vergleich zu KPKL71 erhöhten Menge an GFP-PBP2_xC₄₀₅ in der Vorkultur mit ZnCl_2 ca. zwei Generationen mehr wachsen, ehe ein Wachstumsstopp eintritt. Die Analyse der Zellmorphologie bestätigte ebenfalls einen positiven Effekt des Fehlens der Serinprotease HtrA, da die morphologischen Verformungen der Zellen deutlich später nachgewiesen wurden. In KPKL711 wird das GFP-PBP2_xC₄₀₅-Fusionsprotein nicht abgebaut, d.h. es ist eine deutlich höhere Menge vorhanden, die wiederum in einer längeren Zeit

aufgebraucht wird, was den später eintretenden Wachstumsstopp und die verzögerte morphologische Verformung der Zellen erklärt.

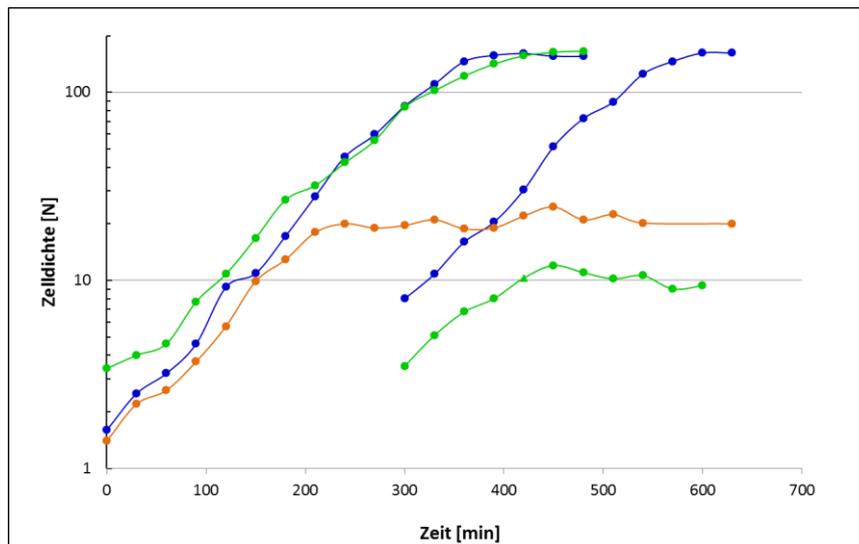


Abb. 4.3: Vergleich des Wachstums von *S. pneumoniae* KPKL71 und KPKL711 in Abwesenheit von Zn^{2+} : Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL71 (C405, P_{ccdD} - gfp - $pbp2x_{C405}$ $\Delta pbp2x$), KPKL711 (KPKL71, $\Delta htrA$) und dem Stamm C405 bei 30 °C. Die Zelldichte der Kulturen wurde in regelmäßigen Abständen gemessen und ist in Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: C405, ●: KPKL71 und ●: KPKL711. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt. ●: C405, ●: KPKL711.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass sowohl KPKL71, als auch KPKL711 während des Depletionsexperiments trotz deutlicher morphologischer Defekte innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht lysieren, sondern in der stationären Wachstumsphase verweilen. Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, dass in diesen Stämmen die Zelllyse verhindert bzw. verzögert wird. Eine Erklärung hierfür liefert möglicherweise der Befund der ca. 2fach erhöhten PBP1a-Menge in dem Stamm C405 und seinen Derivate. Des Weiteren ist zu beachten, dass das *ciaH305*-Allel zu einer moderaten Erhöhung der Promotoraktivität der CiaR-abhängigen Gene führt (Müller *et al.*, 2011). Daher ist es denkbar, dass sich eine von CiaR regulierte Komponente ebenfalls in irgendeiner Form inhibierend auf die Zelllyse auswirken könnte. In Abb. 4.4 ist eine übersichtliche Zusammenfassung der Depletionsexperimente der Stämme DKL031, KPKL81 und KPKL811 zu sehen. Es wird deutlich, dass die konditionalen Stämme DKL031 und KPKL811 in der Lage waren ebenso schnell wie R6 (Generationszeit: 43 min) zu wachsen und eine ebenso hohe Zelldichte zu erreichen. Der Stamm KPKL81, der ein konditionales GFP-PBP2 x_{C405} beinhaltet, wuchs bereits nach dem ersten Überimpfen deutlich langsamer und eine geringere Zelldichte. Das GFP-PBP2 x_{C405} mit zwei PBP2x-Mutationen ist offenbar anfälliger für den Abbau durch die Serinprotease HtrA. Der Stamm KPKL81 ist in der Lage 6,5 Generationen ohne den Induktor zu wachsen; die KPKL81 Zellen deformierten sich und starben am schnellsten von allen in diesem Experiment untersuchten Stämmen. Dem Stamm DKL031 war es möglich sieben Generationen in Abwesenheit von $ZnCl_2$ zu wachsen und die Zellen dieses Stamms starben demnach bei den Depleti

onsexperimenten etwas langsamer, als die des Stamms KPKL81. Der *htrA*-Deletionsstamm KPKL811 war in der Lage 7,5 Generationen ohne ZnCl_2 zu wachsen. Somit ist dieser Stamm durch die Deletion

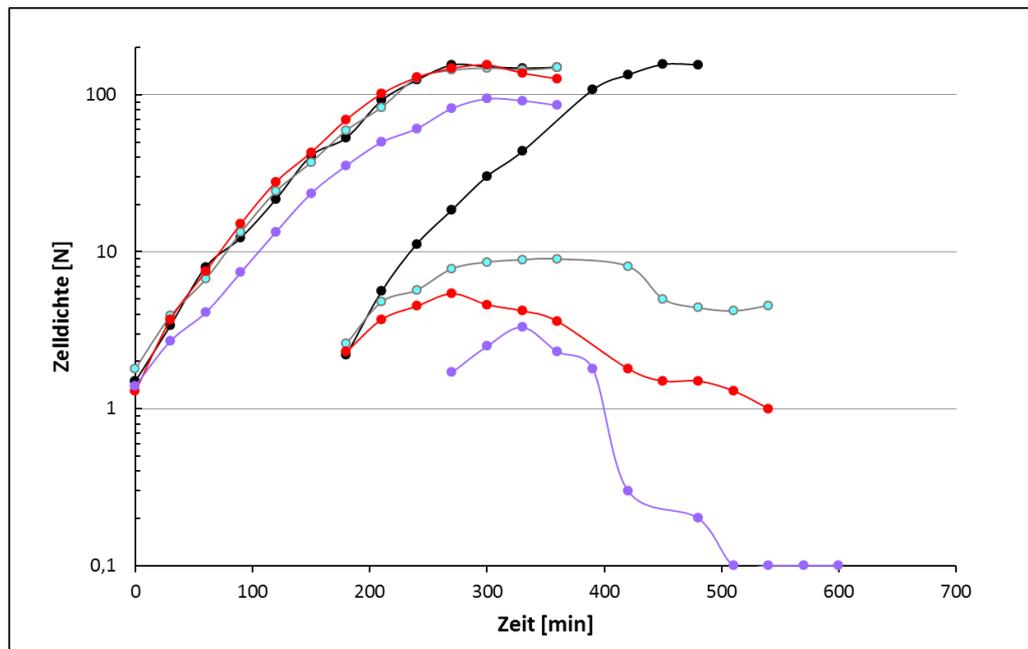


Abb. 4.4: Vergleich des Wachstums von *S. pneumoniae* DKL031, KPKL81 und KPKL811 in Abwesenheit von Zn^{2+} . Wachstumskurven von *S. pneumoniae* DKL031 (R6, $P_{czd-gfp-pbp2x} \Delta pbp2x$), KPKL81 (R6, $P_{czd-gfp-pbp2x_{C405}} \Delta pbp2x$), KPKL811 (KPKL81, $\Delta htrA$) und dem Stamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind in Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit ZnCl_2 (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne ZnCl_2 angeimpft. ●: R6, ●: DKL031, ●: KPKL81 und ●: KPKL811. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne ZnCl_2 überführt.

von HtrA dazu befähigt am längsten von allen hier untersuchten konditionalen Stämmen bei den Depletionsexperimenten zu überleben. Bemerkenswert ist dabei, dass die Deletion von HtrA diesem Stamm auch einen in Abb. 4.4 deutlich zu erkennenden Wachstumsvorteil im Vergleich zu DKL031 verschaffte, obwohl dieser das veränderte GFP-PBP2x_{C405} besitzt.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob sich das Fehlen der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 ebenfalls positiv auf das Wachstum und die Zellmorphologie innerhalb der Depletionsexperimente auswirkt. Anhand von vergleichenden Depletionsexperimente konnte für den *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 eindeutiger Wachstumsvorteil gegenüber DKL031 bewiesen werden. So war dieser Stamm in der Lage 1,5 Generationen länger in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, ehe sich ein Wachstumsstopp einstellte und eine Verformung der Zellen wurde deutlich später beobachtet als in DKL031. Dieses Ergebnis korreliert mit der zuvor beschriebenen Tatsache, dass der *htrA*-Deletionsstamm KPKL09 im Vergleich zu seinem Parentalstamm DKL031 auf dem Western-Blot mit α -GFP-Antikörpern reduzierteren Abbauprodukte aufweist. Zusätzlich konnte für diesen Stamm eine leichte Veränderung in der Lokalisation des GFP-PBP2x-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Somit wurde der Abbau des GFP-PBP2x-Fusionsproteins durch die Serinprotease HtrA mit insgesamt drei unterschiedlichen Experimenten bestätigt.

4.8 Die proteolytische Aktivität der Serinprotease HtrA und seine Substrate in *S. pneumoniae*

Für die proteolytische Aktivität von HtrA ist die katalytische Triade innerhalb der Proteasedomäne, die in *S. pneumoniae* HtrA aus den Aminosäureabfolge His122, Asp152 und das aktive Ser234 besteht (Sebert *et al.*, 2005), von entscheidender Bedeutung. Die verringerte Menge des jeweils veränderten PBP2x in den Laborstämmen *S. pneumoniae* C405 und C606 konnte durch die Einführung des S234A-Austausches in HtrA direkt auf die proteolytische Aktivität dieser Serinprotease zurückgeführt werden, da die *htrA*_{S234}-Komplementationsstämme erneut eine mit dem Wildtypstamm R6 vergleichbare PBP2x-Menge aufwiesen.

Die Substratspezifität von HtrA-Proteasen variiert stark. Für die HtrA-Proteasen DegP und DegQ aus *E. coli* wurde keine hohe Substratspezifität beobachtet; vielmehr sind diese Proteasen allgemein dazu in der Lage, ungefaltete und denaturierte Proteine abzubauen, die sich nach einem Hitzeschock oder anderen Stressbedingungen, im Periplasma akkumulieren (Kolmar *et al.*, 1996). Dagegen ist für die membrangebundene HtrA-Protease DegS aus *E. coli* bekannt, dass sie eine hohe Substratspezifität für RseA aufweist. Durch die proteolytische Aktivität von DegS wird das Transmembranprotein RseA, das normalerweise an SigmaE bindet und dieses dadurch inhibiert, zerstört und eine proteolytische Kaskade als Reaktion auf Zellhüllenstress initiiert (Walsh *et al.*, 2003). Für DegS ist weiterhin gezeigt, dass ihre PDZ-Domäne in der Lage ist Peptide, deren endende C-terminale Sequenz mit der aus OMP-ähnlichen übereinstimmt, zu binden (Walsh *et al.*, 2003). Die proteolytische Aktivität von DegS kann durch die Bindung von falsch lokalisierten, äußeren Membranproteinen an die PDZ-Domäne allosterisch aktiviert werden (Hasselblatt *et al.*, 2007; Wilken *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2003).

Die Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* ist membranassoziiert (Sebert *et al.*, 2005) und besitzt ebenso wie DegS aus *E. coli*, neben einer Protease Domäne, nur eine C-terminale PDZ-Domäne. Innerhalb dieser Arbeit wurden zahlreiche unterschiedliche PBP2x-Substrate der Serinprotease HtrA in *S. pneumoniae* untersucht. So konnte der Abbau der veränderten PBP2x-Proteine aus C405 und C606 anhand von umfangreichen *in vivo*-Studien sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C nachgewiesen werden. Ausführliche *in vivo*-Studien mit diversen GFP-PBP2x-Fusionsproteinen zeigten mehrere deutliche Abbauprodukte, die auf die Anwesenheit der Serinprotease HtrA zurückgeführt werden konnte. Neben GFP-PBP2x und GFP-PBP2x_{C405} wurden auch die Fusionsproteine GFP-PBP2x-OP und GFP-PBP2x-OT von der Serinprotease HtrA ähnlich abgebaut. Dies impliziert, dass die Serinprotease HtrA in der Lage ist mehrere Positionen innerhalb der verschiedenen untersuchten GFP-PBP2x-Fusionsproteine spezifisch zuerkennen und an diesen das Fusionsprotein proteolytisch zu spalten. In den *htrA*-Deletionsstämmen DKL123 und DKL171 sind die Mengen zweier Abbauprodukte deutlich reduziert (Abb. 4.5). Anhand der Größen der detektierten Abbauprodukte und vergleichenden Sequenzanalysen der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine auf Aminosäure-Ebene, konnte die ungefähre Position zweier Schnittstellen der Serinprotease HtrA innerhalb des PBP2x bestimmt werden. Durch das Schneiden der Serinprotease HtrA kurz nach der Transmembrandomäne des PBP2x, ent-

steht in allen GFP-Stämmen, die HtrA beinhalten, vermehrt ein Abbauprodukt mit einer Größe von ca. 35 kDa. Eine identifizierte Schnittstelle befindet sich demnach kurz nach der Transmembrandomäne des PBP2x, die sich bis einschließlich AS 48 erstreckt. Die zweite Schnittstelle von HtrA befindet sich am Ende der N-terminalen Domäne (AS 71-249) von PBP2x. Dieser Schnitt resultiert in

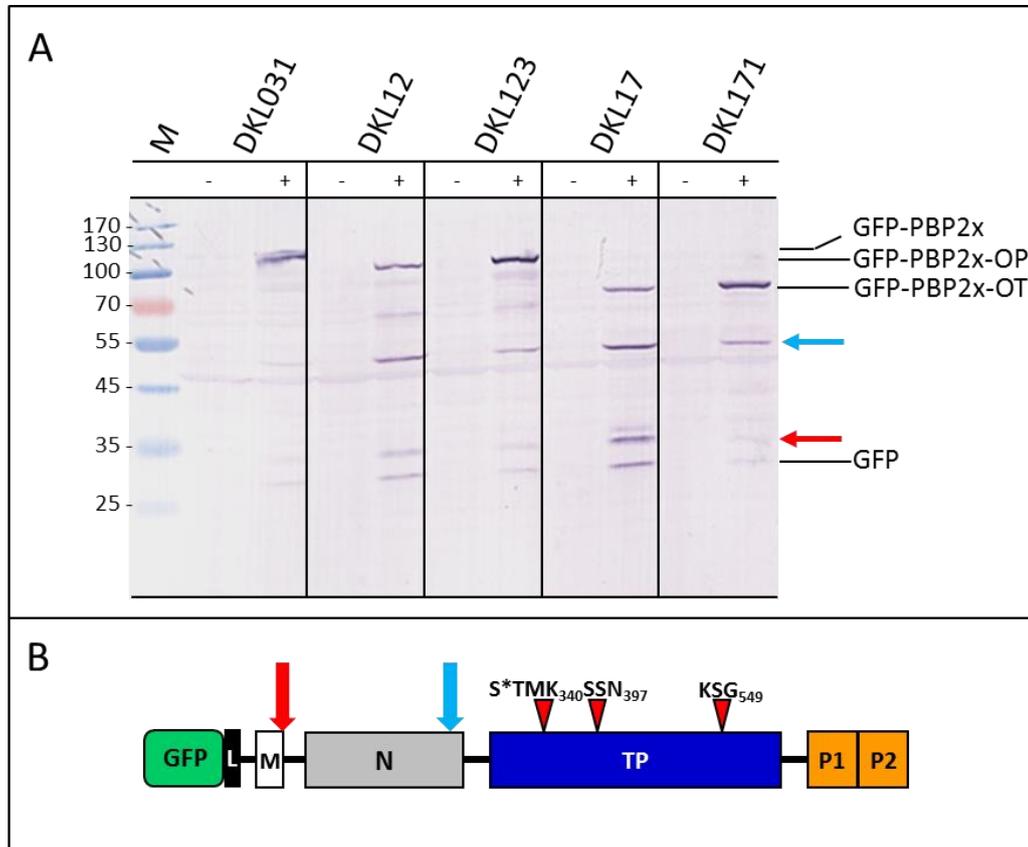


Abb. 4.5: Detektierte Abbauprodukte in diversen GFP-PBP2x-Stämmen und definierte Schnittstellen der Serinprotease HtrA. A: Dargestellt ist das Ergebnis der Western-Blotanalyse der Zellysate bei einer Zelldichte von N 70. Die Namen der untersuchten Stämme sind der Abbildung zu entnehmen. DKL031 (DKL03 $\Delta pbp2x$), DKL12 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2xOP*, Deletion in PBP2x von AS Q633 bis D750), DKL123 (DKL12 $\Delta htrA$), DKL17 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2xOT*, interne Deletion in PBP2x von AS S266 bis D616), DKL171 (DKL17 $\Delta htrA$). Auf ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden jeweils 3 μ l der hergestellten Zellysate aufgetragen. -: Probe von einer in C-Medium gewachsenen Kultur, + : Probe von einer in C-Medium mit 0,15 mM ZnCl₂ gewachsenen Kultur. Der Western-Blot wurde zunächst mit dem primären polyklonalen α -GFP-Antikörper, rabbit IgG fraction (Invitrogen, 1:2.000) und anschließend mit dem sekundären α -Rabbit-Antikörper (Sigma, 1:10.000) inkubiert. M: 4 μ l Prestained Proteinmarker IV (Peqlab, oben). Die Lagen der verschiedenen detektierten GFP-PBP2x-Fusionsproteine (GFP-PBP2x: 110,6 kDa, GFP-PBP2x-OP: 97,6 kDa, GFP-PBP2x-OT: 72,3 kDa) sind angezeigt. Die GFP-Banden (ca. 26 kDa) sind gekennzeichnet. Ein hellblauer Pfeil (ca. 50 kDa) und ein roter Pfeil (ca. 35 kDa) markieren die Lage von Abbauprodukten der GFP-PBP2x-Fusionsproteine. **B:** Dargestellt ist die Domänenstruktur des Fusionsproteins GFP-PBP2x. Grün: GFP Domäne, L: Linkerregion, M: Transmembrandomäne von PBP2x, grau: N-terminale Domäne (AS 71-265, N), blau: penicillin-bindende Transpeptidase-Domäne (TP; AS 266-616) mit den drei konservierten Boxen S*TMK₃₄₀, SSN₃₉₇ und KSG₅₄₉ (rote Dreiecke), orange: C-terminalen PASTA-Domänen (AS 635-691, 692-750, P1 und P2). Farbige Pfeile markieren die ermittelten Positionen der beiden Schnittstellen von HtrA innerhalb des Fusionsproteins. Der Schnitt an der Position des roten Pfeils verursacht dabei das detektierte Abbauprodukt von (ca. 35 kDa). Schneidet HtrA an der Position des hellblauen Pfeils entsteht dagegen ein ca 50 kDa großes Abbauprodukt (s. Abb. 4.5 A).

einer größeren Menge des detektierten Abbauprodukts mit der Größe von ca. 55 kDa. In den Stämmen DKL12 und DKL123, die das Deletions-Fusionskonstrukt GFP-PBP2x-OP besitzen, wird ein zusätzli-

ches Abbauprodukt bei ca. 65 kDa detektiert, deren Menge von der An- und Abwesenheit der Serinprotease unabhängig ist. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass außer HtrA noch eine weitere unbekannte Komponente am Abbau dieses Fusionsproteines beteiligt ist, oder das Protein selbst instabil ist. Die Tatsache, dass bei GFP-PBP2_xC₄₀₅ und GFP-PBP2_x ebenfalls ein Abbauprodukt detektiert wurde, dass unabhängig von der An- oder Abwesenheit von HtrA auftrat, bestätigt diese Vermutung.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudien des GFP-PBP2_x-OT-Fusionsproteins in dem Stamm DKL17 und dem *htrA*-Deletionsstamm DKL171 beweisen erstmals eindeutig die Hypothese, dass die PASTA-Domänen des PBP2_x für eine korrekte septale bzw. äquatoriale Lokalisation dieses essentiellen Enzyms am Zellseptum verantwortlich sind. Durch Fehlen der Serinprotease HtrA wurde das Fusionsprotein GFP-PBP2_x-OT deutlich schwächer abgebaut und lag in größeren Mengen vor. Zusätzlich wurde eine sichtlich reduziertere Menge an den Abbauproteinen detektiert. Da auch das kleinste Abbauprodukt, das der Größe von GFP entspricht, in reduzierter Menge vorlag, führte dies zu einer Verringerung des zytoplasmatischen Fluoreszenzsignals. Dadurch wurde die eigentliche korrekte Lokalisation des GFP-PBP2_x-OT Fusionskonstrukts, am Zellseptum sichtbar.

Um *in vitro*-Interaktionsstudien zur Aktivität von HtrA aus *S. pneumoniae* durchführen zu können, wurde eine proteolytisch aktive und eine inaktive Form von HtrA überexprimiert und getestet. Bemerkenswerterweise war die inaktive Form von HtrA S234A deutlich größer. Dies lässt sich durch einen proteolytischen Selbstabbau von HtrA erklären, der in der S234A-Form von HtrA nicht mehr in dem Maße stattfinden kann. Eine Autoproteolyse wurde bereits in anderen Proteasen der HtrA Familie, unter anderem auch für DegP aus *E. coli* nachgewiesen (Skórko-Glonek *et al.*, 2003). In einer vor kurzem erschienen Studie (Cassone *et al.*, 2012) wurde das aktive und das inaktive HtrA-Protein aus *S. pneumoniae* jeweils ohne vorhergesagtes Signalpeptid überexprimiert. Anhand von denaturierenden Elektrophorese-Experimente mit diesen Proteinen, konnte gezeigt werden, dass das aktive Protein im Vergleich zu inaktiven eine reduzierte Größe besaß, was wiederum auf eine teilweise Autoproteolyse des aktiven HtrA-Proteins zurückgeführt werden konnte (Cassone *et al.*, 2012).

In vitro-Assays mit dem aktiven HtrA-Protein aus *S. pneumoniae* und den GST-PBP2_xC₄₀₅- und GST-PBP2_xC₆₀₆-Proteinen als Substrat, ließen auch nach 20 h Inkubation bei 30 °C bzw. 37 °C keinen Abbau erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der N-terminale GST-Tag die Interaktion der beiden Proteine räumlich behindern könnte oder dass die verwendeten Substratproteine in der Reaktion im deutlichen Überschuss vorlagen. Tatsächlich wurde PBP2_xC₄₀₅, dem zuvor der GST-Tag abgespalten wurde nach 20-stündiger Inkubation sowohl bei 30 °C, als auch bei 37 °C deutlich von HtrA abgebaut, wobei in Gegenwart des proteolytisch inaktiven HtrA-Proteins kein Abbau stattfand. Somit konnte auch *in vitro* bestätigt werden, dass PBP2_x ein Substrat von HtrA ist.

Cassone *et al.*, 2012 beobachteten eine Steigerung der proteolytischen Aktivität des HtrAs aus *S. pneumoniae* in Gegenwart von β -Casein. Dies konnte für PBP2_xC₄₀₅ nicht nachvollzogen werden: in Gegenwart von 1 μ g β -Casein konnte keine Steigerung der Proteaseaktivität beobachtet werden. Es ist

möglich, dass die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden um diesen Effekt sichtbar zu machen. Interessanterweise zeigten diese *in vitro*-Versuche mit zusätzlichem β -Casein jedoch, dass HtrA S234A in der Lage war die geringe Menge an β -Casein proteolytisch abzubauen, ein Beweis dafür, dass die Mutation die proteolytische Aktivität nicht komplett hemmt. Anhand von *in vitro*-Studien konnten Cassone *et al.*, 2012 das Pneumokokken CSP (competence stimulating peptide) als Substrat der Serinprotease HtrA in *S. pneumoniae* identifizieren. Kochan und Dawid, 2013 konnten des Weiteren mit Hilfe von *in vitro*-Studien mit einer aktiven rekombinanten Form von HtrA den Abbau des Peptidpheromons BlpC nachweisen. Mit PBP2x ist noch ein weiteres, für die Zelle essentielles Protein identifiziert worden, das als ein Substrat von HtrA fungiert.

4.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der Laborstamm C405 im Vergleich zum Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 nur ca. 84% des essentiellen Zellteilungsproteins PBP2x besitzt, also ca. 16.000 Moleküle pro Zelle gegenüber 20.000. Der Laborstamm C606 ist genetisch wesentlich instabiler als C405, er weist eine noch geringere Menge dieses wichtigen Enzyms auf und ist dennoch unter Laborbedingungen lebensfähig. Eine Quantifizierung dieser minimalen PBP2x-Menge wäre von großem Interesse, um eine Grenze definieren zu können, wie gering die PBP2x-Menge in der Zelle maximal sein kann, um für das Überleben der Zellen auszureichen. Wichtig wäre weiterhin nachzuweisen, wieviel PBP2x tatsächlich als aktives Protein in der Zelle vorliegen muß, oder in anderen Worten, wieviel 'Überschuß' an PBP2x vorhanden ist. Da PBP2x ein wichtiger Bestandteil des Divisoms ist, wäre es interessant die Stöchiometrie aller dieser Komponenten zu kennen.

Die Depletionsexperimente mit GFP-PBP2x führen zu schwerwiegenden Defekten im Wachstum, in der Zellmorphologie und letztendlich zum Sterben der Zelle. Dies beweist die essentielle Rolle von PBP2x. Nun stellt sich die Frage, wie genau sich das Fehlen des PBP2x auf die Zellwandbiosynthese auswirkt. Über ein Vancomycin-Konjugat (Van-FL) könnte neusynthetisierte Zellwand innerhalb eines Depletionsexperiments mit GFP-PBP2x in lebenden Zellen visualisiert werden. Vancomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum, das an D-Ala-D-Ala bindet, das in noch nicht quervernetzter Zellwand vorkommt. Van-FL markiert daher präferenziell neu synthetisiertes Peptidoglycan (Daniel und Errington, 2003). Solche Versuche wurden schon in *Staphylococcus aureus* (Pinho und Errington, 2003) und *Streptococcus pneumoniae* Zellen (Albarracín Orió *et al.*, 2011; Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012) erfolgreich durchgeführt.

Weiterhin wäre es sinnvoll einen Stamm zu erstellen, der nur ein konditionales ektopisches *gfp-pbp2x* mit den Veränderungen aus C606 besitzt. Da dieses Fusionsprotein mit Sicherheit stärker durch die Serinprotease HtrA abgebaut wird als GFP-PBP2x_{C405}, wäre es interessant zu sehen, wie drastisch sich die geringere Menge des GFP-PBP2x_{C606}-Fusionsproteins, auf das Bakterienwachstum und die Zellmorphologie auswirkt.

In den Laborstämmen C405 und C606 wurden im Vergleich zum Wildtypstamm zwei zusätzliche Proteine auf dem Coomassiegel identifiziert, wobei eines eine Größe von ca. 65 kDa und das andere eine von ca. 130 kDa aufwies. Diese zusätzlichen Proteinbanden konnten weder mit den PBP2x-Veränderungen alleine, noch mit einem durch das *ciaH202*-Allel aktiviertem CiaRH-System in Verbindung gebracht werden. Die Identifizierung dieser Proteine z.B. über Proteomanalysen könnte möglicherweise dazu beitragen den komplexen Zusammenhang zwischen PBP2x und HtrA mit anderen Komponenten aufzuklären.

In den Stämmen mit verändertem PBP2x aus C405 und C606 wird durch die Deletion der Serinprotease HtrA der Effekt der verringerten PBP2x-Menge aufgehoben. Die erhöhte Menge an mutiertem PBP2x führt wiederum zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cefotaxim in den *htrA*-Deletionsstämmen. Der beobachtete resistenz-steigernde Effekt könnte mit Hilfe der zinkinduzierbaren GFP-PBP2x_{C405}-Stämme, die innerhalb dieser Arbeit konstruiert wurden, verifiziert werden. In den Stämmen KPCL7 und KPCL8 liegt PBP2x aus C405 unter induzierten Bedingungen im überexprimierten Zustand vor, da ein zusätzliches GFP-PBP2x_{C405} synthetisiert wird, das ebenfalls in der Lage sein sollte Cefotaxim-Resistenz zu vermitteln. Demnach sollte in den beiden Stämmen nach erfolgter Induktion eine deutlich höhere Resistenz erzielt werden können. Im direkten Vergleich sollte die Resistenz in den Stämmen KPCL71 und KPCL81, die lediglich eine ektopische Kopie des *gfp-php2xC405* besitzen und in den Stämmen KPCL711 und KPCL811, bei denen zusätzlich das Gen *htrA* fehlt, untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen geschaffen, *in vitro*-Studien mit der aktiven Serinprotease HtrA aus *S. pneumoniae* durchzuführen. Weitere bereits unter *in vivo*-Bedingungen bestätigten Substrate von HtrA, wie beispielsweise PBP2x_{C606} oder andere vermutete Substrate, wie das PBP1a aus C405, können nun unter *in vitro*-Bedingungen getestet werden. Die Protein-Protein Interaktionsstudien könnten dabei durch Verbesserungen der Inkubationsbedingungen, wie die eingesetzte Proteinkonzentrationen und die gewählten Reaktionspuffer weiter verbessert und dadurch möglicherweise die Aktivität dieser Protease in den Assays gesteigert werden. Die Enzymaktivität von HtrA müsste idealerweise mit einem optimalen Substrat, das jedoch noch nicht bekannt ist, optimiert werden.

Die unterschiedlichen Fusionsproteine GFP-PBP2x, GFP-PBP2x-OP und GFP-PBP2x-OT wurden unter anderem mit Hilfe von *in vivo*-Experimenten eindeutig als Substrate der Serinprotease HtrA identifiziert. Anhand der Größen der detektierten Abbauprodukte und vergleichenden Sequenzanalysen der GFP-Fusionsproteine auf Aminosäure-Ebene, konnte die ungefähre Position zweier Schnittstellen der Serinprotease HtrA bestimmt werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant die PBP2x-Abbauprodukte, die durch HtrA generiert wurden, zu charakterisieren, z.B. mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie oder der ESI-Methode, um Hinweise auf mögliche Schnittstellen und somit die Spezifität von HtrA zu erhalten. Eine umfangreiche HtrA-Targetsuche könnte auch mit Hilfe von vergleichenden Proteomanalysen vorangetrieben, um die Rolle dieses wichtigen Enzyms und so auch die Funktion von CiaRH besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand der Abbau des essentiellen Zellteilungsproteins PBP2x aus *S. pneumoniae* durch die Serinprotease HtrA. Die PBP2x-Molekülmenge des Wildtypstamms R6 wurde mit Hilfe einer quantitativen Methode ermittelt und ergab einen Wert von ca. 20.000 Molekülen. Für den Laborstamm C405, der unter anderem die zwei AS-Austausche L403F und T526S innerhalb der Transpeptidase-Domäne von PBP2x beinhaltet, konnte eine 6,3fach geringere Menge im Vergleich zum Wildtypstamm R6 nachgewiesen werden. Der Laborstamm C606, der vier AS-Austausche in der Transpeptidase-Domäne von PBP2x aufweist, besitzt sogar eine noch geringere PBP2x-Menge und ist genetisch instabil. Die geringe Menge des essentiellen PBP2x in den beiden Stämmen C405 und C606 konnte jeweils auf die proteolytische Aktivität der Serinprotease HtrA zurückgeführt werden. Die alleinige Auswirkung der PBP2x-Mutationen aus C405 und C606 auf die PBP2x-Menge wurden im definierten genetischen Hintergrund des Wildtypstamms R6 untersucht. Dabei konnte bewiesen werden, dass auch hier schon geringere Mengen an PBP2x vorliegen, die Mutationen also direkt Einfluß auf die Struktur von PBP2x haben und somit durch HtrA abgebaut werden. Diese Mutanten besitzen einen temperatursensitiven Resistenzphänotyp, wobei das Wachstum bei 30 °C zu verlängerten Zellen führte.

Innerhalb umfassender Komplementationstudien wurde die *htrA*-Expression in unterschiedlichen Stämmen stufenweise erhöht, wobei korrelierend mit den steigenden HtrA-Mengen in den Zellen jeweils stufenweise verringerte PBP2x-Menge erwartet wurden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Serinprotease HtrA je nach genetischem Hintergrund nur bis zu einem bestimmten Level bzw. überhaupt nicht überexprimiert werden kann. Sobald dieser Level überschritten wird, wehrt sich die Zelle mit gravierenden Mutationen, die sowohl die proteolytische Aktivität, als auch die vollständige Proteinsynthese der Serinprotease HtrA inhibieren.

Im Wildtypstamm R6 wurde die Serinprotease HtrA anhand von Temperaturshiftexperimenten als nicht temperatursensitiv nachgewiesen. Dagegen benötigen Stämme mit verändertem PBP2x bei Hitzestress die Serinprotease HtrA, die durch den Abbau von falsch gefalteten Proteinen ein besseres Wachstum ermöglicht.

Die Auswirkung der verringerten PBP2x-Menge auf die Lokalisation des veränderten und niederaffinen PBP2x aus C405 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie in verschiedenen genetischen Hintergründen untersucht. Das GFP-PBP2x_{C405}-Fusionsprotein wurde hierbei durch die Serinprotease HtrA, je nach genetischem Hintergrund, unterschiedlich stark abgebaut, was wiederum in einem höheren Anteil an zytoplasmatisch leuchtenden Zellen resultiert. Sobald die Serinprotease HtrA in diesen Stämmen fehlte, wurde das Fusionsprotein nicht mehr abgebaut und eine korrekte septale bzw. äquatoriale Lokalisation wurde sichtbar. Demnach befindet sich die geringe PBP2x-Menge immer in der Region, in der sie am dringenden benötigt wird - dem Zellseptum.

Das GFP-PBP2x-OT-Fusionsprotein, dem die Transpeptidasedomäne fehlt, wird ebenfalls durch die Serinprotease HtrA abgebaut. Sobald *htrA* jedoch deletiert wurde, zeigte sich eine septale bzw. äquatoriale Lokalisation des Fusionsproteins. Somit konnte zum ersten Mal eindeutig bewiesen werden, dass

ausschließlich die PASTA-Domänen des PBP2x für die Lokalisation dieses essentiellen Enzyms am Zellseptum verantwortlich sind.

Die Größen der detektierten Abbauprodukte der GFP-Fusionsproteine gaben zudem Aufschluss über die ungefähre Position zweier Schnittstellen der Serinprotease HtrA, nämlich kurz nach der Transmembrandomäne von PBP2x und am Ende der N-terminalen Domäne.

Die Rolle des essentiellen PBP2x aus R6 und C405 bei der Zellteilung wurde anhand von Depletionsexperimenten eingehend untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die kontinuierliche Dezimierung des GFP-PBP2x bzw. GFP-PBP2x_{C405} in allen drei konditionalen Stämmen negativ auf das Wachstum und die Zellmorphologie auswirkte. Die Stämme waren in der Lage mehrere Generationen in Abwesenheit des Induktors zu wachsen, da sich innerhalb der Zelle noch ausreichend synthetisiertes Fusionsprotein aus der Vorkultur befand, bevor sich ein Wachstumsstopp einstellte.

Die Aufreinigung eines proteolytisch aktiven HtrA-Proteins und einer Form mit (S234A) im aktiven Zentrum von HtrA aus *S. pneumoniae* gelang im Rahmen dieser Arbeit. Die proteolytische Aktivität des HtrA-Proteins konnte anhand von β -Casein Assays bestätigt werden. Der Abbau des Proteins PBP2x_{C405} und sogar der PBP2x_{wt} konnten erstmals unter *in vitro*-Bedingungen als Substrate von HtrA nachgewiesen werden.

Die Daten dieser Arbeit bestärkt die Hypothese, dass ungefaltene PBP2x-Proteine durch die Sec-Translokase exportiert und anschließend in die Membran integriert werden. Dabei führt die Serinprotease HtrA die Proteinqualitätskontrolle durch und baut falsch gefaltete Proteine, oder Proteine, die sich nicht im Komplex befinden, ab.

6 Literaturverzeichnis

- Acebo P., Nieto C., Corrales M. A., Espinosa M. und López P.** (2000): Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring single or multiple copies of the gene encoding the green fluorescent protein. *Microbiol* **146**(Pt 6): 1267-1273.
- Alba B. M., Leeds J. A., Onufryk C., Lu C. Z. und Gross C. A.** (2002): DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the rE-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**(16): 2156-2168.
- Alba B. M. und Gross C. A.** (2004): Regulation of the *Escherichia coli* σ E-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**(3): 613-619.
- Albarracín Orió A. G., Piñas G. E., Cortes P. R., Cian M. B. und Echenique J.** (2011): Compensatory evolution of pbp mutations restores the fitness cost imposed by β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **7**(2):e1002000.
- Alloing G., Granadel C., Morrison D. A. und Claverys J. P.** (1996): Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **21**(3): 471-478.
- Andrews J. M.** (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* **48**(1): 5-16.
- Attali C., Frolet C., Durmort C., Offant J., Vernet T. und Di Guilmi, A. M.** (2008): *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun* **76**(2): 466-476.
- Avery O. T., MacLeod C. M. und McCarty M.** (1944): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **79**(2): 137-158.
- Bæk K. T., Vegge C. S., Skórko-Glonek J. und Brøndsted L.** (2011): Different contributions of HtrA protease and chaperone activities to *Campylobacter jejuni* stress tolerance and physiology. *Appl Environ Microbiol* **77**(1): 57-66.
- Barcus V. A., Ghanekar K., Yeo M., Coffey T. J. und Dowson C. G.** (1995): Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **126**(3): 299-303.
- Beilharz K., Nováková L., Fadda D., Branny P., Massidda O. und Veening J.-W.** (2012): Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(15): E905-913.
- Bentley S. D., Aanensen D. M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., Donohoe K., Harris D., Murphy L., Quail M. A., Samuel G., Skovsted I.C., Kalltoft M. S., Barrell B., Reeves P. R., Parkhill J. und Spratt B. G.** (2006): Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**(3): e31.
- Bertani G.** (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**(3): 293-300.
- Biørnstad T. J. und Håvarstein L. S.** (2011): ClpC acts as a negative regulator of competence in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiol* **157**(Pt 6): 1676-1684.
- Bouhss A., Trunkfield A. E., Bugg T. D. und Mengin-Lecreulx D.** (2008): The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 208-233.

- Bowers E. F. und Jeffries L. R.** (1955): Optochin in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol* **8**(1): 58-60.
- Bradford M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brahms S und Brahms J.** (1980): Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* **138**(2): 149-178.
- Bratcher P. E., Kim K. H., Kang J. H., Hong J. Y. und Nahm M. H.** (2010): Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiol* **156**: 555-560.
- Brazas M. D., Breidenstein E. B., Overhage J. und Hancock R. E.** (2007): Role of lon, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(12): 4276-83.
- Breckner K.** (2012): Untersuchung der Lokalisation des Penicillin-bindenden Proteins 2x mittels Fluoreszenz-mikroskopie in *Streptococcus pneumoniae*. Masterarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Breidenstein E. B., Khaira B.K., Wiegand I., Overhage J. und Hancock R. E.** (2008): Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(12): 4486-91.
- Brown J. H.** (1919): The use of blood agar for the study of streptococci. *Monograph No.9*.
- Burnette W. N.** (1981): Western-Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
- Cassone M., Gagne A. L., Spruce L. A., Seeholzer S. H. und Sebert M. E.** (2012): The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. *J Biol Chem* **287**(46): 38449-59.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. und Prasher D. C.** (1994): Green fluorescent protein as a marker of gene expression. *Science* **263**(5148): 802-805.
- Clausen T., Southan C. und Ehrmann M.** (2002): The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* **10**(3): 443-455.
- Clausen T., Kaiser M., Huber R. und Ehrmann M.** (2011): HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Bio* **12**(3): 152-162.
- Contreras-Martel C., Job V., Di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2006): Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **355**(4): 684-696.
- Contreras-Martel C., Dahout-Gonzalez C., Martins Ados S., Kotnik M. und Dessen A.** (2009): PBP active site flexibility as the key mechanism for beta-lactam resistance in pneumococci. *J Mol Biol* **387**(4): 899-909.
- Dagkessamanskaia A., Moscoso M., Hénard V., Guiral S., Overweg K., Reuter M., Martin B., Wells J. und Claverys J. P.** (2004): Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol* **51**(4): 1071-1086.

- Daniel R.A. und Errington J.** (2003): Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**(6): 767-776.
- Dawid S., Sebert M. E. und Weiser J. N.** (2009): Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *J Bacteriol* **191**(5): 1509-1518.
- Denapaite D., Chi F., Maurer P., Nolte O. und Hakenbeck R.** (2007): Mechanism of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: targets, gene transfer, and mutations. In *Molecular Biology of Streptococci*. Hakenbeck, R. und Chhatwal, G. S. (Hrsg.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, UK. 290-303.
- Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J. und Dideberg O.** (2001): Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J Biol Chem* **276**(48): 45106-45112.
- Dougherty T. J., Kennedy K., Kessler R. E. und Pucci M. J.** (1996): Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**(21):6110-6115.
- Dowson C. G., Hutchison A., Brannigan J. A., George R. C., Hansman D., Liñares J., Tomasz A., Smith J. M. und Spratt B. G.** (1989a): Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8842-8846.
- Dowson C. G., Hutchison A. und Spratt B. G.** (1989b): Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **3**(1): 95-102.
- Du Plessis M., Smith A. M. und Klugman K. P.** (2000): Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **6**(2): 127-131.
- Eberhardt A., Wu L. J., Errington J., Vollmer W. und Veening J.-W.** (2009): Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol* **74**(2): 395-408.
- Enright M. C. und Spratt B. G.** (1998): A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**(Pt 11): 3049-3060.
- Eriksen K. R.** (1945): Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type 1. *Acta Pathol Microbiol Scand* **22**(4): 398-405.
- Fadda D., Santona A., D'Ulisse V., Ghelardini P., Ennas M. G., Whalen M. B. und Massidda O.** (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol* **189**(4): 1288-1298.
- Fan K., Zhang J., Zhang X. und Tu X.** (2011): Solution structure of HtrA PDZ domain from *Streptococcus pneumoniae* and its interaction with YYF-COOH containing peptides. *J Struct Biol* **176**(1): 16-23.
- Feldman C. und Klugman K.** (1997): Pneumococcal Diseases. *Current Opinion in Infectious Diseases* **10**: 109-115.

- Fernández L., Breidenstein E. B., Song D. und Hancock R. E.** (2011): Role of intracellular proteases in the antibiotic resistance, motility, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**(2): 1128-32.
- Filipe S. R. und Tomasz A.** (2000): Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4891-4896.
- Fleurie A., Cluzel C., Guiral S., Freton C., Galisson F., Zanella-Cleon I., Di Guilmi A. und Grangeasse C.** (2012): Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **83**(4): 746-758.
- Fontana R., Cerini R., Longoni P., Grossato A. und Canepari P.** (1983): Identification of streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. *J Bacteriol* **155**(3): 1343-1350.
- Garcia-Bustos J. F., Chait B. T. und Tomasz A.** (1988): Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol* **170**(5): 2143-2147.
- Garcia-Bustos J. und Tomasz A.** (1990): A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5415-5419.
- Gasc A. M., Giammarinaro P., Richter S. und Sicard M.** (1998): Organization around the dnaA gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol* **144**(Pt 2): 433-439.
- George N.** (2012): Inducible Expression of *htrA* in *Streptococcus pneumoniae*. Masterarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Ghuysen J. M.** (1991): Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**:37-67.
- Giammarinaro P., Sicard M. und Gasc A.M.** (1999): Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol* **145**(Pt 8): 1859-1869.
- Giles A. F. und Reynolds R. E.** (1979): *Bacillus megaterium* resistance to cloxacillin accompanied by a compensatory change in penicillin-binding proteins. *Nature* **280**(5718): 167-168.
- Goffin C. und Ghuysen J. M.** (1998): Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1079-1093.
- Goffin C. und Ghuysen J. M.** (2002): Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyl-transferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 702-738.
- Gordon E., Mouz N., Duee E. und Dideberg O.** (2000): The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**(2): 477-485.
- Grebe T. und Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(4): 829-834.

- Grebe T., Paik J. und Hakenbeck R.** (1997): A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol* **179**(10): 3342-3349.
- Griffith F.** (1928): The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**(2): 113-159.
- Groh S.** (2002): Cefotaxim-resistente Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*: Beitrag der Histidinkinase CiaH und der Serinprotease HtrA zum Phänotyp der Mutanten C102 und 202. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Guenzi E., Gasc A. M., Sicard M. A. und Hakenbeck R.** (1994): A two-component signaltransducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**(3): 505-515.
- Gunnison J. B., Fraher M. A., Pelcher E. A. und Jawetz E.** (1968): Penicillin-resistant variants of pneumococci. *Appl Microbiol* **16**(2): 311-314.
- Hakenbeck R. und Kohiyama M.** (1982): Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* **127**(2): 231-236.
- Hakenbeck R., Briese T. und Ellerbrok H.** (1986): Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem* **157**(1):101-106.
- Hakenbeck R., Ellerbrok H., Martin C., Morelli G., Schuster G., Severin A. und Tomasz A.** (1993): Penicillin-binding protein 1a and 3 in *Streptococcus pneumoniae*: what are essential PBPs. In Bacterial growth and lysis metabolism and structure of the bacterial sacculus. de Pedro, M. A., Höltje, J.-V. und Löffelhardt, W. (Hrsg.). Plenum Press, New York. 335-340.
- Hakenbeck, R.** (1995): Target-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* **50**(8): 1121-1127.
- Hakenbeck R.** (1998): Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* – Evolution und Verbreitung. *Chemo J* **7**(2): 43-49.
- Hakenbeck R., Tornette S. und Adkinson N.F** (1987): Interaction of non-lytic b-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**: 755-760.
- Hakenbeck R., König A., Kern I., Van Der Linden M., Keck W., Billot-Klein D., Legrand R., Schoot B. und Gutmann L.** (1998): Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**(7): 1831-1840.
- Hakenbeck R., Brückner R., Denapaite D. und Maurer P.** (2012): Molecular mechanism of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* **7**(3): 1-6.
- Halfmann A., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2007a). A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **268**(2): 217-224.
- Halfmann A., Kovacs M., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2007b): Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol Microbiol* **66**(1): 110-126.
- Halfmann, A.** (2008): Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.

- Halfmann A., Schnorpfeil A., Müller M., Marx P., Günzler U., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2011): Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**(2): 96-104.
- Hanage W. P., Kaijalainen T., Herva E., Saukkoriipi A., Syrjänen R. und Spratt B. G.** (2005): Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J Bacteriol* **187**(17): 6223-6230.
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4): 557-580.
- Hansen G. und Hilgenfeld R.** (2013): Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol Life Sci* **70**(5): 761-775.
- Hansman D.** (1975): Antibiotic sensitivity pattern of pneumococci relatively insensitive to penicillin and cephalosporin antibiotics. *Med J Aust* **2**(19): 740-742.
- Hardie, J. M. und Whiley, R. A.** (1995): The genus *Streptococcus*. In The genera of lactic acid bacteria. Wood, B.J.B. und Holzappel, W.H. (Hrsg.). Blackie Academic & Professional 55-124.
- Hasselblatt H., Kurzbauer R., Wilken C., Krojer T., Sawa J., Kurt J., Kirk R., Hasenbein S., Ehrmann M. und Clausen T.** (2007): Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes Dev* **21**(20): 2659-2670.
- Håvarstein L. S., Coomaraswamy G. und 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.
- Heintz M.** (2006): Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Helle L., Kull M., Mayer S., Marincola G., Zelder M. E., Goerke C., Wolz C. und Bertram R.** (2011): Vectors for improved Tet repressor-dependent gradual gene induction or silencing in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol* **157**(Pt 12): 3314-3323.
- Heß N.** (2012): Forschungspraktikum, Technische Universität Kaiserslautern.
- Holzwarth G und Doty P.** (1965): The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J Am Chem Soc* **87**: 218-228.
- Hoskins J., Matsushima P., Mullen D. L., Tang J., Zhao G., Meier T. I., Nicas T. I. und Jaskunas S. R.** (1999): Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**(20): 6552-6555.
- Hotchkiss R. D.** (1952): Induction of penicillin resistance by transformation. *Bull N. Y. Acad Med* **28**(5): 346-348.
- Höltje J. V.** (1998): Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 181-203.
- Ibrahim Y. M., Kerr A. R., McCluskey J. und Mitchell T. J.** (2004a): Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**(16): 5258-5266.

- Ibrahim Y. M., Kerr A. R., McCluskey J. und Mitchell T. J.** (2004b): Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**(6): 3584-3591.
- Jacobs M. R., Koornhof H. J., Robins-Browne R. M., Stevenson C. M., Vermaak Z. A., Freiman I., Miller G. B., Witcomb M. A., Isaacson M., Ward J. I. und Austrian R.** (1978): Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* **299**(14): 735-740.
- Johnson F. H., Shimomura O., Saiga Y., Gershman L. C., Reynolds G. T., und Waters J. R.** (1962): Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **60**(1):85-103.
- Jones C. H., Bolken T. C., Jones K. F., Zeller G. O. und Hruby D. E.** (2001): Conserved DegP protease in gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **69**(9): 5538-45.
- Jones G. und Dyson P** (2006): Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside. *J Bacteriol* **188**(21):7470-7476.
- Jonsson S., Musher D. M., Chapman A., Goree A. und Lawrence E. C.** (1985): Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J Infect Dis* **152**(1): 4-13.
- Kell C. M., Sharma U. K., Dowson C. G., Town C., Balganesht T. S. und Spratt B. G.** (1993): Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **106**(2): 171-175.
- Kim D. Y. und Kim K. K.** (2005): Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* **38**(3): 266-274.
- Kindrachuk K. N., Fernández L., Bains M. und Hancock R. E.** (2011): Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(5): 1874-82.
- Kislak J. W., Razavi L. M., Daly A. K. und Finland M.** (1965): Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* **250**(3): 261-268.
- Kloosterman T. G., van der Kooi-Po M. M., Bijlsma J. J. und Kuipers O. P.** (2007): The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn²⁺ stress by activation of the Zn²⁺ resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **65**(4): 1049-1063.
- Klugman K. P.** (1990): Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* **3**(2): 171-196.
- Kochan T. J und Dawid S.** (2013): The HtrA protease of *Streptococcus pneumoniae* controls density dependent stimulation of the bacteriocin blp locus via disruption of pheromone secretion. *J Bacteriol* [Epub ahead of print]
- Koch B.** (2006): Biochemische und genetische Charakterisierung der PBP2x Mutanten C405, C503 und C606 von *Streptococcus pneumoniae* R6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Kolmar H., Waller P. R. und Sauer R. T.** (1996): The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* **178**(20): 5925-5929.
- Krauß J., van der Linden M., Grebe T. und Hakenbeck R.** (1996): Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP-targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2**(2): 183-186.

- Krojer T., Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M. und Clausen T.** (2002): Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* **416**(6879): 455-9.
- Laemmli U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lacks S. und Hotchkiss R. D.** (1960): A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochem Biophys Acta* **39**: 508-518.
- Laible G. und Hakenbeck R.** (1987): Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **1**(3): 355-363.
- Laible G., Hakenbeck R., Sicard M. A., Joris B. und Ghuysen J. M.** (1989): Nucleotide sequences of the *pbpX* genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant, C506. *Mol Microbiol* **3**(10): 1337-1348.
- Laible G. und Hakenbeck R.** (1991): Five independent combinations of mutations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**(21): 6986-6990.
- Laible G., Spratt B. G. und Hakenbeck R.** (1991): Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**(8): 1993-2002.
- Lange R., Wagner C., de Saizieu A., Flint N., Molnos J., Stieger M., Caspers P., Kamber M., Keck W. und Amrein K.E.** (1999): Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**(1): 223-234.
- Lipinska B., Sharma S. und Georgopoulos C.** (1988): Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* **16**(21): 10053-10067.
- Li W., Srinivasula S. M., Chai J., Li P., Wu J. W., Zhang Z., Alnemri E. S. und Shi Y.** (2002): Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* **9**(6): 436-441.
- Livney Y. D., Schwan A. L. und Dalglish D. G.** (2004): A study of β -casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry. *J. Dairy Sci* **87**(11): 3638-3847.
- Lyon W. R. und Caparon M. G.** (2004): Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S. *Infect Immun* **72**(3): 1618-1625.
- Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O. und Dessen A.** (2006): Penicillin-binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* **30**(5): 673-691.
- Macheboeuf P., Di Guilmi A. M., Job V., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2005): Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 577-582.
- Maestro B., Novaková L., Heseck D., Lee M., Leyva E., Mobashery S., Sanz J. M. und Branny P.** (2011): Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett* **585**(2): 357-63.

- Martin C., Sibold C. und Hakenbeck R.** (1992): Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *Embo J* **11**(11): 3831-3836.
- Marx P.** (2013): Die Steuerung der Aktivität des Response Regulators CiaR des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Mascher T., Zähner D., Merai M., Balmelle N., de Saizieu A. B. und Hakenbeck R.** (2003): The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* **185**(1): 60-70.
- Massidda O., Anderluzzi D., Friedli L. und Feger. G.** (1998): Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol* **144**(Pt 11): 3069-3078.
- Maurer P., Koch B., Zerfass I., Krauss J., van der Linden M., Frère J. M., Contreras-Martel C. und Hakenbeck R.** (2008): Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: three new mutational pathways for remodelling an essential enzyme into a resistance determinant. *J Mol Biol* **376**(5): 1403-16.
- Maurer P., Todorova K., Sauerbier J. und Hakenbeck R.** (2012): Mutations in *Streptococcus pneumoniae* PBP2x: importance of the C-terminal PASTA-domains for beta-lactam binding. *Microb Drug Resist* **18**(3): 314-321.
- McKee C. M und Houck C. L.** (1943): Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. *Proc Soc Exp Biol Med* **53**: 33-34.
- Merai M.** (2003): Analyse von Zielgenen des Zwei-Komponenten Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Miller J. H.** (1972): Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Minnen A., Attaiech L., Thon M., Gruber S. und Veening J.-W.** (2011): SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **81**(3): 676-688.
- Mitchell T. J.** (2003): The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**(3): 219-230.
- Morand B. und Mühlemann K.** (2007): Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35): 14098-103.
- Morlot C., Zapun A., Dideberg O., und Vernet T.** (2003): Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**(3): 845-855.
- Morlot C., Noirclerc-Savoye M., Zapun A., Dideberg O. und Vernet T.** (2004): The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**(6): 1641-1648.
- Morlot C., Pernot L., Le Gouellec A., Di Guilmi A. M., Vernet T., Dideberg O. und Dessen A.** (2005): Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **280**(16): 15984-15991.

- Moscoso M., Domenech M. und Garcia E.** (2010): Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* **77**: 1052-1064.
- Mosser J. L. und Tomasz A.** (1970): Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* **245**(2): 287-98.
- Mullis K. B. und Faloona F.A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1): 263-273.
- Muñoz R., Dowson C. G., Daniels M., Coffey T. J., Martin C., Hakenbeck R. und Spratt B. G.** (1992): Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **6**(17): 2461-2465.
- Musher D. M.** (1992): Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 1992 **14**(4): 801-807.
- Müller M.** (2011): Die Regulation des Zweikomponentensystems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* und die phänotypischen Konsequenzen. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Müller M., Marx P., Hakenbeck R. und Brückner R.** (2011): Effect of new alleles of the histidine kinase gene *ciaH* on the activity of the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Microbiology* **157**(Pt 11): 3104-3112.
- Negri M. C., Morosini M. I., Baquero M. R., del Campo R., Blázquez J. und Baquero F.** (2002): Very low cefotaxime concentrations select for hypermutable *Streptococcus pneumoniae* populations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(2): 528-30.
- Nelson A. L., Roche A. M., Gould J. M., Chim K., Ratner A. J. und Weiser J. N.** (2007): Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* **75**(1): 83-90.
- Noirclerc-Savoie M., Le Gouëllec A., Morlot C., Dideberg O., Vernet T. und Zapun A.** (2005): In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **55**(2): 413-424.
- Oberhettinger P.** (2007): Konstruktion und Charakterisierung eines Integrationsvektors zur induzierbaren Expression klonierter Gene in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Olaya-Abril A., Gómez-Gascón L., Jiménez-Munguía I., Obando I. und Rodríguez-Ortega M. J.** (2012): Another turn of the screw in shaving Gram-positive bacteria: Optimization of proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics* **75**(12): 3733-46.
- Onder O., Turkarslan S., Sun D. und Daldal F.** (2008): Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics* **7**(5): 875-890.

- Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y. und Remington S. J.** (1996): Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* **273**: 1392-1395.
- Ottolenghi E. und Hotchkiss R. D.** (1962): Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med* **116**: 491-519.
- Page M. J. und Di Cera E.** (2008): Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem* **283**: 30010-30014.
- Paik J., Kern I., Lurz R. und Hakenbeck R.** (1999): Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **181**(12): 3852-3856.
- Pallen M. J. und Wren B. W.** (1997): The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* **26**(2): 209-221.
- Pares S., Mouz N., Pétilot Y., Hakenbeck R. und Dideberg O.** (1996): X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**(3): 284-289.
- Park I. H., Pritchard D. G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M. C. und Nahm M. H.** (2007): Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **45**(4): 1225-1233.
- Pasteur L., Chamberland C., Roux E. und Thuillier L.** (1881): Sur la rage. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Paris, **92**: 12591260.
- Patterson M. J.** (1991): *Streptococcus*. In *Medical Microbiology*. Baron, S. (Hrsg.). Churchill Livingstone, New York, USA.
- Paul B. J., Ross W., Gaal T. und Gourse R. L.** (2004): rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **38**:749-70.
- Pereira S. F., Henriques A. O., Pinho M. G., de Lencastre H. und Tomasz A.** (2007): Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**(9): 3525-3531.
- Pereira S. F., Henriques A. O., Pinho M. G., de Lencastre H. und Tomasz A.** (2009): Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **72**(4): 895-904.
- Peters K.** (2009): Promotoridentifikation und Expressionsanalyse von Genen der Penicillin-bindenden Proteine in *S. pneumoniae* R6. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G. und Cormier M. J.** (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* **111**(2): 229-233.
- Poquet I., Saint V., Seznec E., Simoes N., Bolotin A. und Gruss A.** (2000): HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol* **35**(5): 1042-1051.
- Pucci M. J. und Dougherty T. J.** (2002): Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **184**(2):588-591.
- Rawlings N. D., Morton F.R., Kok C. Y., Kong J. und Barrett A. J.** (2008): MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**: D320-325.
- Rosch J. W. und Caparon M. G.** (2005): The ExPortal: an organelle dedicated to the biogenesis of secreted proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **58**(4): 959-68.

- Rutschmann J.** (2011): PBP2a als Resistenzdeterminante in Labormutanten und klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Salles C., Creancier L., Claverys J. P. und Mejean V.** (1992): The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20**(22): 6103.
- Sanbongi Y., Ida T., Ishikawa M., Osaki Y., Kataoka H., Suzuki T., Kondo K., Ohsawa F. und Yonezawa M.** (2004): Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2244-2250.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad. Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. CSH Press, New York, USA.
- Saras J. und Heldin C. H.** (1996): PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* **21**(12): 455-458.
- Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A. und Charlier P.** (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 234-258.
- Schäfer F.** (2007): Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Der Einfluss der CiaRH regulierten Gene auf die genetische Kompetenz. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Scheffers D. J. und Pinho M. G.** (2005): Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(4): 585-607.
- Schleifer K. H. und Ludwig W.** (1995): Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. In The genera of lactic acid bacteria. Wood, B.J.B. und Holzapfel, W.H. (Hrsg.). Blackie Academic & Professional.
- Schmitt G.** (2005): Molekulare Werkzeuge zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem regulatorischen Zwei-Komponenten-System CiaRH und der Lokalisation des Penicillin-Bindeproteins PBP2x in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit. Technische Universität Kaiserslautern.
- Schnorpfeil A.** (2010): Die Rolle der Histidinkinase CiaH, im Zwei-Komponenten-System CiaRH, in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Scholz O., Thiel A., Hillen W. und Niederweis M.** (2000): Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *Eur J Biochem* **267**(6): 1565-1570.
- Schweizer I.** (2011): Lokalisation der Penicillin-Bindenden Proteine 1a und 2x mittels Fluoreszenzmikroskopie in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Sebert M. E., Palmer L. M., Rosenberg M. und Weiser J. N.** (2002): Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **70**: 4059-4067.

- Sebert M. E., Patel K. P., Plotnick M. und Weiser J. N.** (2005): Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *J Bacteriol* **187**(12): 3969-3979
- Severin A., Schuster C., Hakenbeck R. und Tomasz A.** (1992): Altered murein composition in a DD-carboxy-peptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **174**(15): 5152-5155.
- Severin A. und Tomasz A.** (1996): Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**(1): 168-174.
- Sexauer A.** (2012): Die Rolle von PBP2a bei β -Lactam-Resistenz in der Cefotaxim resistenten Labormutantenfamilie C006 von *Streptococcus pneumoniae*. Bachelorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Sham L. T., Tsui H. C., Land A. D., Barendt S. M. und Winkler M. E.** (2012): Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol* **15**(2): 194-203.
- Shimomura O., Johnson F. H. und Saiga Y.** (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.
- Sicard A. M.** (1964): A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae* and its use for the study of reciprocal transformations at the *amiA* locus. *Gen* **50**: 31-44.
- Sifaoui F., Kitzis M. D. und Gutmann L.** (1996): In vitro selection of one-step mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to different oral beta-lactam antibiotics is associated with alterations of PBP2x. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(1): 152-6.
- Skórko-Glonek J., Wawrzynow A., Krzewski K., Kurpierz K. und Lipinska B.** (1995): Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene* **163**(1): 47-52.
- Skórko-Glonek J., Zurawa D., Kuczwaro E., Wozniak M., Wypych Z. und Lipinska B.** (1999): The *Escherichia coli* heat shock protease HtrA participates in defense against oxidative stress. *Mol Gen Genet* **262**(2): 342-350.
- Skórko-Glonek J., Zurawa D., Tanfani F., Scirè A., Wawrzynów A., Narkiewicz J., Bertoli E. und Lipińska B.** (2003): The N-terminal region of HtrA heat shock protease from *Escherichia coli* is essential for stabilization of HtrA primary structure and maintaining of its oligomeric structure. *Biochim Biophys Acta* **1649**(2): 171-82.
- Smith A. M und Klugman K. P.** (1998): Alterations in PBP1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(6): 1329-1333.
- Spiess C., Beil A. und Ehrmann M.** (1999): A temperature dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**(3): 339-347.
- Spratt B. G.** (1994): Resistance to β -lactam antibiotics. In J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. 517-534.
- Stahlmann C.** (2010): Herstellung von Konstrukten zur Untersuchung von PBP2x in *S. pneumoniae* R6 mittels Fluoreszenzmikroskopie. Forschungspraktikum, Technische Universität Kaiserslautern.

- Stahlmann C.** (2011): Fusion des grün fluoreszierenden Proteins an das Penicillin-Bindeprotein 2x zur Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Sternberg G.** (1881): A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injections of human saliva. An experimental research. *National Board of Health Billetin* **2**: 781-783.
- Strauch K. L. und Beckwith J.** (1988): An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(5): 1576-1580.
- Strauch K. L., Johnson K. und Beckwith J.** (1989): Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol* **171**(5): 2689-2696.
- Sung C. K., Li H., Claverys J. P. und Morrison D. A.** (2001): An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**(11): 5190-5196.
- Swamy K. H., Chung C. H. und Goldberg A. L.** (1983): Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. *Biochem Biophys* **224**(2): 543-554.
- Throup J. P., Koretke K. K., Bryant A. P., Ingraham K. A., Chalker A. F., Ge Y., Marra A., Wallis N. G., Brown J. R., Holmes D. J., Rosenberg M. und Burnham M. K.** (2000): A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**(3): 566-576.
- Tipper D. J. und Strominger J. L.** (1965): Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **54**(4): 1133-1141.
- Todd E. W und Hewitt L. F.** (1932): A new culture medium fort the production of anti- genic streptococcal hemolysin. *J. Path. Sc. Bact* **35**: 973-974.
- Todorova K.** (2010): β -Lactam-Resistenz in *Streptococcus* spp.: Eine neue Resistenzdeter-minante *murE*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Tomasz, A.** (2000): *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. Larchmont, NY: Mary Ann Liebert.
- Tomasz A. und Muñoz R.** (1995): Beta-Lactam antibiotic resistance in gram-positive bacterial pathogens of the upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms. *Microb Drug Resist* **1**(2): 103-109.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Tran T. D., Kwon H. Y., Kim E. H., Kim K. W., Briles D. E., Pyo S. und Rhee D. K.** (2011): Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Anti-microb Agents Chemother* **55**(6): 2714-28.
- Tsui H.-C. T., Keen S. K., Sham L.-T., Wayne K. J. und Winkler M. E.** (2011): Dynamic distribution of the SecA and SecY translocase subunits and septal localization of the HtrA surface chaperone/protease during *Streptococcus pneumoniae* D39 cell division. *MBio* **2**(5): e00202-11.

- van Dam J. E., Fleer A. und Snippe H.** (1990): Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**(1): 1-47.
- Veith D. und Veith M.** (2005): Ein Regenbogen aus dem Ozean. Biologie fluoreszierender Proteine. *Biol Unserer Zeit*. **6**(35): 394-404.
- Vollmer, W.** (2007): Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. In Molecular biology of streptococci. Hakenbeck, R. und Chhatwal, S. (Hrsg.) Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. 83-117.
- Walsh N. P., Alba B. M., Bose B., Gross C. A. und Sauer R. T.** (2003): OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**(1): 61-71.
- Weber B., Ehlert K., Diehl A., Reichmann P., Labischinski H. und Hakenbeck R.** (2000). The *fib* locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett* **188**(1): 81-85.
- Weng L., Biswas I. und Morrison D. A.** (2009): A self-deleting Cre-lox-ermAM cassette, Cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods* **79**(3): 353-357.
- Wilken C., Kitzing K., Kurzbauer R., Ehrmann M. und Clausen T.** (2004): Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell* **117**(4): 483-494.
- Yang F., Moss L. G. und Phillips G. N.** (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**(10): 1246-1251.
- Yeats C., Finn R. D. und Bateman A.** (2002): The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**(9): 438.
- Yu J., Carvalho M. da G. S., Beall B. und Nahm M. H.** (2008): A rapid pneumococcal serotyping system based on monoclonal antibodies and PCR. *J Med Microbiol* **57**(Pt 2): 171-78.
- Zapun A., Vernet T. und Pinho M. G.** (2008): The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 345-360.
- Zerfass I., Hakenbeck R. und Denapaite 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.
- Zerfaß I.** (2010): PBP2x-Mutationen in *Streptococcus pneumoniae*: Auswirkungen auf β -Laktam-resistenz und Zellphysiologie. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Zhao G., Meier T. I., Kahl S. D., Gee K. R. und Blaszczyk L. C.** (1999): Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1124-1128

7 Anhang

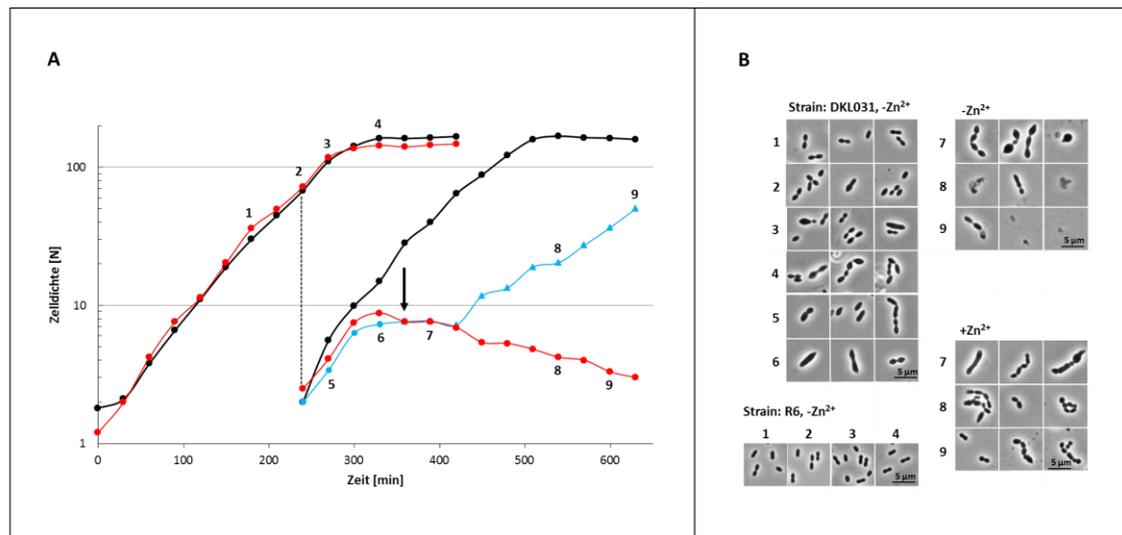


Abb. 7.1: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* DKL031 in Abwesenheit von Zn^{2+} : **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* DKL031 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x* Δ *pbp2x*) und dem Kontrollstamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: R6, ●: DKL031. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt und beim Erreichen der stationären Phase mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) induziert. ●: DKL031 vor der Induktion, ▲: DKL031 nach der Induktion, ●: DKL031 ohne Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-5 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* DKL031 im Vergleich zu R6. Pro Zeitpunkt (1-9) sind jeweils 1-3 mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μ m) ist angegeben.

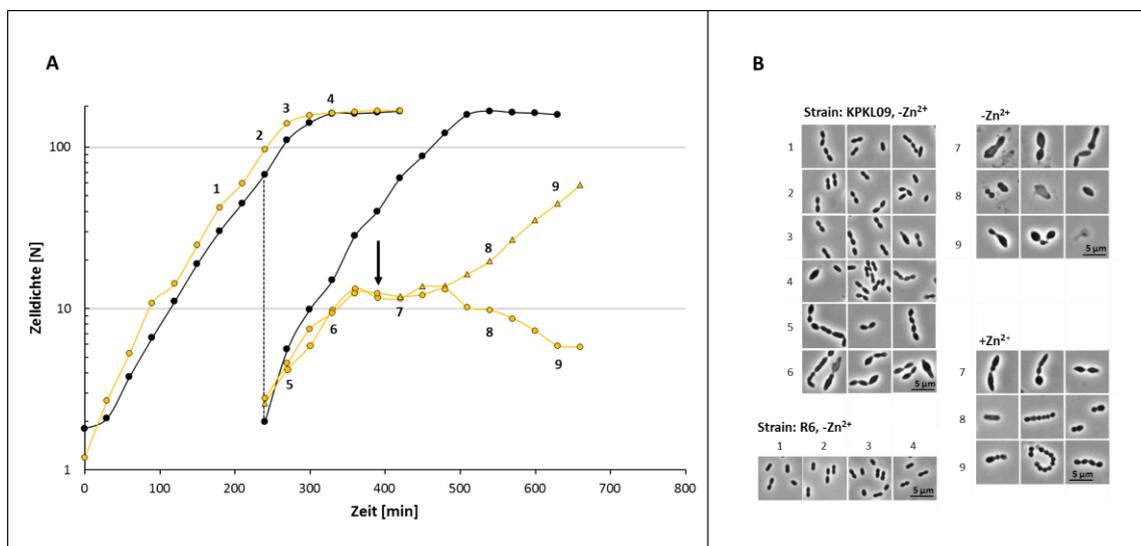


Abb. 7.2: Wachstum und Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL09 in Abwesenheit von Zn^{2+} : **A:** Wachstumskurven von *S. pneumoniae* KPKL09 (R6, P_{czcD} -*gfp-pbp2x* Δ *pbp2x* Δ *htrA*) und dem Kontrollstamm R6 bei 30 °C. Die Zelldichten der Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen gemessen und sind als Nephelo [N] angegeben. Die Stämme wurden in C-Medium mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) bis zu einer Zelldichte von N 70 wachsen gelassen, zweimal gewaschen und in einer 1:20 Verdünnung in C-Medium ohne $ZnCl_2$ angeimpft. ●: R6, ●: KPKL09. Sobald die Kulturen eine Zelldichte von N 70 erreicht hatten, wurden die Zellen erneut in einer 1:20 Verdünnung in frisches C-Medium ohne $ZnCl_2$ überführt und beim Erreichen der stationären Phase mit $ZnCl_2$ (0,15 mM) induziert. ●: KPKL09 vor der Induktion bzw. ohne Induktion, ▲: KPKL09: nach der Induktion, ↓: Zeitpunkt der Induktion. Die Zahlen 1-6 markieren die Zeitpunkte, an denen Proben für die phasenmikroskopische Analyse steril entnommen wurden. **B:** Zellmorphologie von *S. pneumoniae* KPKL09 im Vergleich zu R6. Pro Zeitpunkt (1-9) sind jeweils 1-3 mikroskopische Bilder dargestellt. Der Maßstab (5 μ m) ist angegeben.

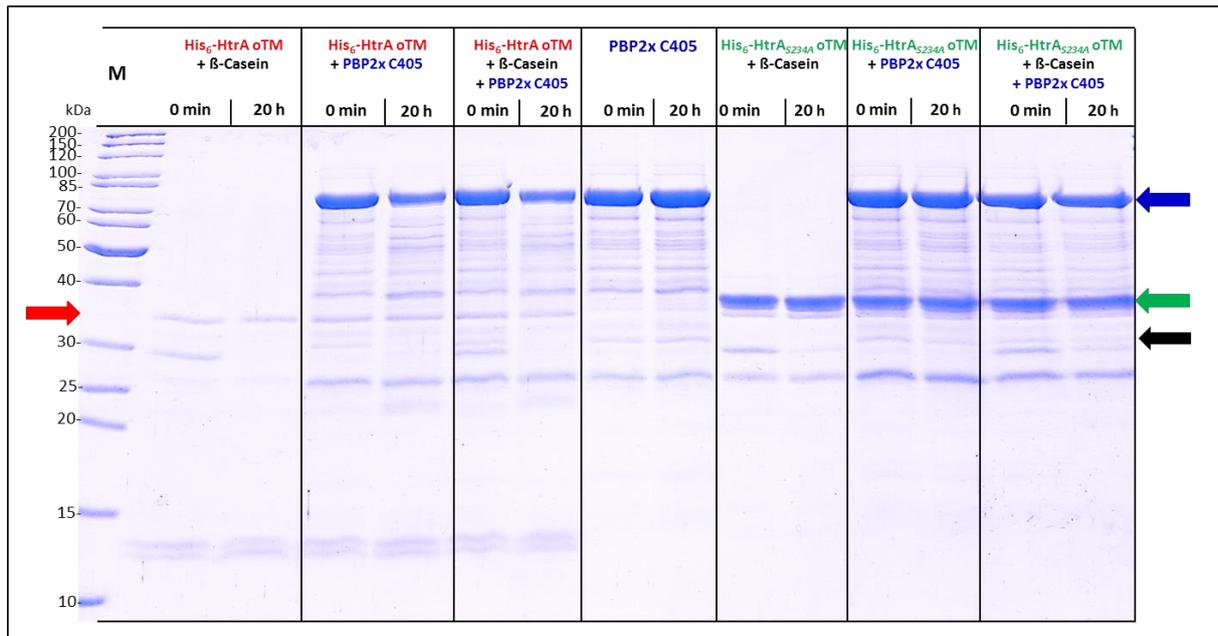


Abb. 7.3: *In vitro*-Assays mit His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM und PBP2_xC405 als Substrat bei 30 °C: Gezeigt sind die Ergebnisse der *in vitro*-Assays in 1x PBS bei 30 °C. Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten, zuvor schockgefrorenen Proteins His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM mit 6,25 µg des Substrats PBP2_xC405 (AS 49-750) gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x PBS auf 50 µl aufgefüllt. Jeweils einem Reaktionsansatz wurde zusätzlich 1 µg β-Casein zugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 5 µg His₆-HtrAoTM bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM dem 1 µg β-Casein zugegeben wurde und eine Reaktionsansatz mit 6,25 µg PBP2_x C405 (AS 49-750). Die Proben wurden bei 30 °C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Den Reaktionsansätzen wurden vor Beginn der Inkubation (0 min) und nach 20 h Inkubation jeweils 20 µl Probe entnommen. In einer 15 %iger SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt. M (links): 4 µl Proteinmarker II (PeqLab). Die Lage der His₆-HtrAoTM-Proteine (kleiner als ca. 39 kDa, roter Pfeil) bzw. His₆-HtrA_{S234A}oTM-Proteine (ca. 39 kDa, grüner Pfeil), β-Casein-Proteine (ca. 25 kDa, schwarzer Pfeil) und der PBP2_xC405-Proteine (ca. 100 kDa, blauer Pfeil) sind markiert.

Danksagung

Im Laufe meiner Promotion gab es Menschen, die mich fachlich und persönlich unterstützt und damit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle möchte ich Ihnen dafür danken.

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich herzlich für die Vergabe des spannenden Themas, für Ihr großes Interesse, die wissenschaftliche Förderung und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. John Cullum gilt mein Dank für die freundliche Bereitschaft zur Zweitkorrektur dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Dalia Denapaite für die ausgezeichnete, kompetente und engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die ständige Hilfsbereitschaft bei allen praktischen und theoretischen Fragen, die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen, die auch über das Fachliche hinausgehen und die immerwährende Motivation.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Reinhold Brückner und Herrn Dr. Patrick Maurer für hilfreiche Anregungen im Zusammenhang mit der Serinprotease HtrA bzw. mit den Quantifizierungsstudien.

Vielen Dank an Herrn Jun. Prof. Dr. Sandro Keller und seiner Arbeitsgruppe für die Ermöglichung der Analyse von Proteinen mittels CD-Spektroskopie. Ein besonderer Dank geht hierbei an Herrn Sebastian Fiedler für die Betreuung bei der experimentellen Durchführung.

Bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Friauf und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Ermöglichung der Quantifizierungsexperimente und die freundliche Bereitstellung von Geräten und des Arbeitsmaterials. Besonderer Dank gebührt hier Dr. Jan Kullmann und vor allem Michael Wolf für die tatkräftige Unterstützung bei diesen Experimenten.

Danke auch an Christoph Stahlmann, Inga Schweizer, Kerstin Breckner, Nathalie Heß, Dr. Alexander Halfmann und vielen weiteren Ehemaligen für die Bereitstellung von Konstrukten und Stämmen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Danken möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Labor, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Allen voran meinen Bürokolleginnen Inga und Marina und meinen Laborpartnern und Ex-Laborpartnern: Christoph, Nadja, Nathalie H., Julia P., Ilka, Yvonne, Katya, Patrick, Anke und Julia S. für die vielen schönen und auch lustigen Stunden im Labor. Ohne Euch hätte die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht.

Besonders Inga, die seit Ihrem Forschungspraktikum mit mir Seite an Seite gearbeitet hat, möchte ich für die Freundschaft, die treue Unterstützung an guten und auch an nicht so guten Tagen danken. Danke für die unzähligen Stunden im und außerhalb des Labors und die vielen interessanten, aufmunternden und amüsanten Gespräche.

Ein großes Dankeschön geht an meine wunderbaren Eltern und an meine Brüder Walter und Andreas. Ich danke Euch für die großartige Unterstützung und das Interesse während meiner gesamten Doktorarbeit und dafür, dass Ihr mich in anstrengenden und schweren Zeiten aufgemuntert und immer felsenfest an mich geglaubt habt. Meinem Bruder Andreas danke ich zudem dafür, dass er mich mit den Tricks und Kniffen von Word vertraut gemacht hat und für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

Ein rießiges Dankeschön gilt Dir Thomas: Für Deine tatkräftige Hilfe, Dein liebevolles Verständnis und Deine unendliche Geduld, gerade im letzten Abschnitt meiner Doktorarbeit.

Lebenslauf

Hochschulbildung:

- seit 07/2009 Technische Universität Kaiserslautern
Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion in der Abteilung
Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie
Thema der Promotion: „Der Abbau des essentiellen Penicillin-
Bindeproteins 2x in *S. pneumoniae* durch die Serinprotease HtrA“
- 2003-2009 Technische Universität Kaiserslautern
Studium der Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Biochemie, Zellbiologie
Abschluss: Diplom
Thema der Diplomarbeit: „Promotoridentifikation und Expressi-
onsanalyse von Genen der Penicillin-bindenden Proteine in
S. pneumoniae R6“

Schulbildung:

- 1994-2003 Albert-Schweizer Gymnasium in Kaiserslautern
Abschluss Allgemeine Hochschulreife
- 1993-1994 Grundschule in Rodenbach
- 1990-1993 Geschwister-Scholl Grundschule in Kaiserslautern

Publikationen

Peters K., Schweizer I., Stahlmann C., Beilharz K., Veening J.-W., Hakenbeck R., Denapaite D. (2013): *Streptococcus pneumoniae* PBP2X mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domain and is essential for cell shape maintenance; Veröffentlichung in Vorbereitung