

Genetische Analyse von Resistenzdeterminanten in *Streptococcus pneumoniae*

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

von

Dipl.-Biol. Marina Meiers

Datum der wissenschaftlichen Aussprache

13.11.15

Vorsitzender der Prüfungskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

1. Berichterstatter: Herr PD. Dr. Reinhold Brückner

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John Cullum

Kaiserslautern, 2015

D386

Hiermit erkläre ich, Marina Meiers, die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, September 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Die Gattung <i>Streptococcus</i>	4
2.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
2.1.2 <i>Streptococcus oralis</i>	5
2.2 Die Zellwand von <i>S. pneumoniae</i>	7
2.2.1 Peptidoglykansynthese und Penicillin-bindende Proteine (PBPs)	7
2.2.1.1 Penicillin-bindende Proteine (PBPs).....	9
2.2.2 Die Teichonsäuren - Aufbau und Funktion.....	10
2.3 β -Lactamresistenz in <i>S. pneumoniae</i>	11
2.3.1 Die Wirkungsweise der β -Lactamantibiotika	11
2.3.2 PBP-vermittelte β -Lactamresistenz	12
2.3.3 Nicht-PBP Resistenzdeterminanten	12
2.3.3.1 Die Glycosyltransferase CpoA	13
2.3.3.2 Das Zwei-Komponentensystem CiaRH	14
2.3.3.3 Die Aminoacyl-Ligase MurM	18
2.3.3.4 Die Aminosäureligase MurE	19
2.4 Entstehung und Verbreitung der β -Lactamresistenz	19
2.4.1 Natürliche Kompetenz in <i>S. pneumoniae</i>	19
2.4.2 Horizontaler Gentransfer	21
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit	23
3 Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Bakterienstämme	24
3.1.2 Plasmide	29
3.1.3 Oligonukleotide	31
3.1.4 Nährmedien.....	34
3.1.4.1 C+Y-Medium zur Kultivierung von <i>S. pneumoniae</i>	34
3.1.4.2 D-Blutagar.....	37
3.1.4.3 LB-Medium und -Agar	37
3.1.4.4 Nährmedienzusätze.....	38
3.2 Methoden.....	39

3.2.1 Anzucht und Stammkonservierung	39
3.2.1.1 Anzucht im Flüssigmedium.....	39
3.2.1.2 Stammkonservierung	39
3.2.2 Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	40
3.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	40
3.2.2.2 Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	40
3.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz	40
3.2.3 Transformation von <i>E. coli</i>	41
3.2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen	41
3.2.3.2 Transformation.....	41
3.2.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken	42
3.2.5 Isolation der Gesamt-RNA aus <i>S. pneumoniae</i>	44
3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.2.7 Quantifizierung von DNA.....	45
3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese	45
3.2.8.1 DNA-Elution aus Agarosegelen.....	46
3.2.9 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	47
3.2.9.1 Kultur-PCR	49
3.2.9.2 Überlappende PCR	49
3.2.9.3 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	51
3.2.10 DNA-Sequenzierung.....	51
3.2.11 Genomsequenzierung	52
3.2.12 Enzymreaktionen mit DNA	53
3.2.12.1 Restriktion von Nukleinsäuren	53
3.2.12.2 Ligation	53
3.2.13 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von <i>S. pneumoniae</i>	54
3.2.14 Analyse von Expressionssignalen in <i>S. pneumoniae</i>	55
3.2.15 Nachweis der β -Galactosidaseaktivität	56
3.2.15.1 Durchführung des β -Galaktosidaseassays.....	57
3.2.15.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	58
3.2.15.3 Auswertung des β -Galactosidaseassays.....	58
3.2.16 Herstellung von Zelllysaten und Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen	59
3.2.17 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	60
3.2.17.1 Herstellung von SDS-Gelen.....	61

3.2.17.2 Färbung der SDS-Gele.....	62
3.2.18 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot	63
3.2.19 Trennung der Membran- und cytoplasmatischen Fraktion mittels Ultrazentrifugation ...	65
3.2.20 Microarray-gestützte Transkriptionsanalyse.....	65
3.2.20.1 Das <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6/TIGR –Oligonukleotid Set.....	65
3.2.20.2 Spotten	66
3.2.20.3 Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Proben.....	68
3.2.20.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben.....	68
3.2.20.5 Scannen der hybridisierten Slides	71
3.2.20.6 Auswertung der Microarray-Daten	71
3.2.21 Isolierung und Auftrennung von Glycolipiden.....	72
3.2.22 Isolierung und Auftrennung von Phospholipiden	73
3.2.23 Integration eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems	73
3.2.24 Inaktivierung des Serinproteasegens <i>htrA</i>	74
3.2.25 Inaktivierung von <i>spr1992</i>	75
3.2.26 Inaktivierung von <i>murN</i>	75
4. Ergebnisse	76
4.1 Piperacillin-resistente Labormutanten und die Glycosyltransferase CpoA.....	76
4.1.1. Bestimmung des Startcodons von CpoA	78
4.1.2 Phänotypische Charakterisierung der <i>cpoA</i> -Mutanten.....	81
4.1.2.1 Das Lipidprofil der <i>cpoA</i> -Mutanten	81
4.1.2.1.1 Glycolipide	81
4.1.2.1.2 Phospholipide	82
4.1.2.2 Der pleiotrope Phänotyp der <i>cpoA</i> -Mutanten	84
4.1.2.2.1 Das Wachstum der <i>cpoA</i> -Mutanten	84
4.1.2.2.2 Das Wachstum der <i>cpoA</i> -Mutanten bei niedrigem pH-Wert - Empfindlichkeit gegenüber Säurestress	86
4.1.2.2.3 Der Mg ²⁺ -Bedarf der <i>cpoA</i> -Mutanten.....	87
4.1.2.2.4 Das Lyseverhalten der <i>cpoA</i> -Mutanten.....	88
4.1.2.2.5 Der Kompetenzphänotyp der <i>cpoA</i> -Mutanten	89
4.1.2.2.6 Resistenz gegenüber Bacitracin.....	90
4.1.3 Die Glycosyltransferase CpoA und das Zweikomponentensystem CiaRH.....	91
4.1.4 Die Membranverankerung von CpoA in P104	92
4.1.5 Globale Transkriptionsanalyse der <i>cpoA</i> -Mutanten.....	94

4.1.5.1 Detaillierte Betrachtung der innerhalb der Transkriptomanalyse signifikant veränderten Gene	96
4.1.5.1.1 Das Hitzeschockprotein ClpL	96
4.1.5.2 Das Membranprofil der <i>cpoA</i> -Mutanten.....	98
4.2.1 Ermittlung der Resistenzdeterminanten	101
4.2.1.1 Genomsequenzierung der Mutanten PCP und PCPCCO	104
4.2.2. Charakterisierung eines neuen <i>ciaH</i> -Allels.....	106
4.2.2.1. Das <i>ciaH773</i> -Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin induzierten Promotors	109
4.2.2.2 Charakterisierung des <i>ciaH773</i> -Allels.....	112
4.2.2.2.1 Einfluss des <i>ciaH773</i> -Allels auf die β -Laktamresistenz.....	113
4.2.2.2.2 Einfluss des <i>ciaH773</i> -Allels auf die Kompetenz.....	114
4.2.3 Die Mutanten PCPC und PCPC.....	116
4.2.3.1 Nachstellen der Veränderungen in PCPC und PCPC.....	120
4.2.4 Das Ausschalten von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems im WT R6	125
4.2.4.1 Globale Transkriptionsanalyse – Der Einfluss von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems	128
4.2.4.2 Auswirkungen der Deletion der Serinprotease HtrA auf die PBP2x-Menge	132
4.2.5 Die rätselhafte Rolle der Punktmutation in <i>spr1992</i>	134
4.2.6 Veränderung in PCPCCO - die Punktmutation in <i>pbp2b</i>	139
4.2.7 Steigerung des Resistenzniveaus? - Deletion der Aminoacylligase MurN	143
5. Diskussion	145
5.1 Die Glycosyltransferase CpoA.....	145
5.1.1 Die <i>cpoA</i> -Veränderungen und die Folgen für die Glycolipidsynthese.....	145
5.1.2 Die Verschiebung des Lipidpools und die Auswirkungen auf die Cytoplasmamembran ...	147
5.1.3 Der pleiotrope Phänotyp der <i>cpoA</i> -Mutanten	149
5.2 Die Analyse β -Lactamresistenter Pneumokokken.....	154
5.2.1 Die Grenzen des horizontalen Gentransfers	154
5.2.2 Die Veränderungen in den letzten drei Selektionsschritten	158
5.2.2.1. Die Punktmutationen in PCPC - Charakterisierung eines neuen <i>ciaH</i> -Allels und die Rolle der Veränderung in <i>spr1992</i>	158
5.2.2.1.1 Die rätselhafte Rolle der Punktmutation in <i>spr1992</i>	162
5.2.2.2 Die Veränderung des fünften Selektionsschrittes – Das Ausschalten der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems.....	164
5.2.2.3 Die Veränderung des sechsten Selektionsschrittes - Die Punktmutation in <i>pbp2b</i>	172
5.3 Ausblick.....	176

6. Literaturverzeichnis	177
7. Anhang.....	196
Publikationen	
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius	MHK	Minimale Hemmkonzentration
A, Ala	Alanin	min	Minute
AA	Acrylamid	ml	Milliliter
ABC	ATP-binding-casette	mM	Millimolar
<i>A. laidlawii</i>	<i>Acheloplasma laidlawii</i>	mol %	Molprozent
APS	Ammoniumpersulfat	M	N-Acetylmuraminsäure
AS	Aminosäure	N	Nephelowert
ATP	Adenosintriphosphat	O	Oxacillin
BAA	Bisacrylamid	OD	Optische Dichte
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	P	Piperacillin
bp	Basenpaare	P, Pro	Prolin
BSA	Bovine Serum Albumine	p. a.	pro analysi
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	PBP	Penicillinbindeprotein
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
bzw.	beziehungsweise	Q, Gln	Glutamin
C	Cefotaxim	RT	Raumtemperatur
cDNA	komplementäre DNA	S, Ser	Serin
CSP	competence stimulating peptide	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
D, Asp	Aspartat	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
dest.	destilliert	<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	t	Zeit
DNase	Desoxyribonuklease	T, The	Threonin
E, Glu	Glutamat	Tm	Schmelztemperatur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	WTA	Wandteichonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	N, Asn	Asparagin
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
<i>et al.</i>	und andere	P, Pro	Prolin
EtOH	Ethanol	p. a.	pro analysi
g	Generationszeit	PBP	Penicillinbindeprotein
g	Gramm	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
G, Gly	Glycin	Q, Gln	Glutamin
GalGalDAG	Digalactosyldiacylglycerin	R, Arg	Arginin
GalGlcDAG	Glycosyldiacylglycerin	RNA	Ribonukleinsäure
G	N-Acetylglukosamin	RNase	Ribonuklease
H, His	Histidin	rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
hmw	High moleculare weight	S, Ser	Serin
I, Ile	Isoleucin	s	Sekunden
K, Lys	Lysin	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
kb	Kilobasen	SDS	Natriumdodecylsulfat
kDA	Kilodalton	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
lmw	low moleculare weight	<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
LTA	Lipoteichonsäure	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
M	Molar	T, The	Threonin
Mg	Miligramm	TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Units		
µg	Mikrogramm		

μl	Mikroliter
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
WTA	Wandteichonsäure
Y, Tyr	Tyrosin

1. Zusammenfassung

Der rasante Anstieg an β -lactamresistenten Bakterienstämmen stellt ein weltweites medizinisches Problem dar. Für die Bekämpfung von resistenten Stämmen ist es wichtig, den Mechanismus der Resistenzentstehung zu verstehen. Die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehenden *S. pneumoniae*-Isolate entstammen zwei unterschiedlichen Strategien zur Untersuchung der Entstehung und Verbreitung β -lactamresistenter Pneumokokken.

Die im Fokus des ersten Teils der vorliegenden Arbeit stehende Glycosyltransferase CpoA wurde von Grebe *et al.* (1997) als Resistenzdeterminante in zwei spontan-resistenten Labormutanten, P104 und P106, entdeckt. Beide wurden ausgehend von dem sensitiven *S. pneumoniae* R6 auf einer erhöhten Piperacillinkonzentration selektioniert. Berg *et al.* und Edman *et al.*, beschrieben CpoA biochemisch als α -Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin-Synthase, die einen Galactosylrest von UDP-Galaktose auf Glycosyldiacylglycerin (GlcDAG) überträgt (Berg *et al.*, 2001; Edman *et al.*, 2003) und so Galactosyl-Glycosyldiacylglycerin (GalGlcDAG), das Hauptglycolipid der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* bildet. Durch Detektion der Glycolipide in R6, P104, P106 und R6 Δ cpoA konnten diese in vitro Daten in vivo bestätigt werden. Keine der cpoA-Mutanten wies eine detektierte Menge an GalGlcDAG auf. Neben der Veränderung des Glycolipidverhältnisses offenbarte die Darstellung der Membranlipide auch eine Änderung des Phospholipidverhältnisses. Die phänotypische Charakterisierung der cpoA-Mutanten zeigte ein pleiotropes Phänotyp, das mit einer verlangsamten Generationszeit, einer verminderten Säuretoleranz, einem erhöhten Bedarf an zweiwertigen Magnesiumionen, dem Verlust der natürlichen Transformierbarkeit, einer verzögerten Triton-induzierte Zelllyse, sowie einer reduzierten Bacitracinresistenz einher ging. Durch eine Microarray-basierte, globale Transkriptomanalyse konnte gezeigt werden, dass vor allem Membranproteine, wie PTS-Systeme und ABC-Transporter, eine unterschiedliche Expressionsstärke im Vergleich zum Parentalstamm R6 aufwiesen.

Als Grundlage für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit diente ein von Todorova (2010) durchgeführtes Transformationsexperiment, indem der sensitive *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA des hochresistenten *S. oralis* Uo5 transformiert wurde. In sechs Transformationsschritten mit sukzessiv ansteigender Antibiotikakonzentration, konnten sechs Transformanten mit einer stufenweise erhöhten β -Lactamresistenz generiert werden. Durch die Arbeiten von Todorova *et al.* (2015), konnte bereits gezeigt werden, dass drei niederaffine PBPs, sowie die Aminosäureligase MurE den Resistenzanstieg der ersten drei Selektionsschritte vermitteln. In dieser Arbeit wurde sich mit den Transformanten der Selektionsschritte vier, fünf und sechs

1.Zusammenfassung

beschäftigt. Durch Genomsequenzierung und anschließende Überprüfung bestimmter Sequenzbereiche konnten die Grenzen des horizontalen Gentransfers aufgewiesen werden. Der Resistenzanstieg in den letzten drei Selektionsschritten wurde nicht durch die Übertragung resistenter Uo5-Gene, sondern einzig durch Punktmutationen vermittelt. Die Charakterisierung, sowie die phänotypischen Auswirkungen der Veränderungen standen nach ihrer Identifizierung im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

In der Transformante des vierten Selektionsschrittes, PCPC, konnten zwei Punktmutationen identifiziert werden. Eine Punktmutation innerhalb des Histidinkinasegens *ciaH* des Zweikomponentensystems CiaRH und eine weitere in *spr1992*, welches für ein hypothetisches Protein codiert. Bei CiaH handelt es sich um die erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante, die in *S. pneumoniae* entdeckt wurde (Guenzi *et al.*, 1994). Es zeigte sich, dass das neu entdeckte *ciaH*-Allel (*ciaH773*) eine Hyperaktivität des CiaRH-Systems bewirkt und zur Instabilität neigt. Um das Risiko von sekundären Mutationen zu mindern, wurde die Expression von *ciaH773* unter die Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass *ciaH773* einen 11-fachen Anstieg der CiaR-vermittelten Genregulation, sowie eine Erhöhung der β -Lactamresistenz bewirkt und zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit führt. Neben der Punktmutation in *ciaH*, konnte im vierten Selektionsschritt noch eine weitere Veränderung in *spr1992* identifiziert werden. Beim Genprodukt von *spr1992* handelt es sich um hypothetisches Protein. Blastanalysen lassen auf eine regulatorische Funktion von Spr1992 schließen. Die innerhalb dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten stark auf einen Beitrag der Punktmutation in *spr1992* zur CiaR-vermittelten Genregulation, sowie zur Cefotaximresistenz in PCPC hin. Zukünftige Untersuchungen könnten den Zusammenhang von *spr1992* mit dem CiaRH-System weiter spezifizieren.

Innerhalb des fünften Selektionsschrittes konnte eine 10 bp Deletion in der Serinprotease HtrA detektiert werden, die aufgrund der Lokalisation im ersten Drittel der Serinprotease mit einem Knockout von HtrA vergleichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die HtrA-Deletion zu einer weiteren Steigerung der CiaRH-vermittelten Genregulation, sowie zu einer Erhöhung der β -Lactamresistenz führt. Durch Einbringen des *ciaH773*-Allels in *S. pneumoniae* R6 und anschließender *htrA*-Deletion konnte dieser regulatorische Effekt auch im Wildtyp-Hintergrund nachgewiesen werden. Durch anschließend durchgeführte globalen Transkriptomanalysen konnten weitere Einblicke in die regulatorische Funktion von HtrA im Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems gewonnen werden.

In PCPCCO, der Transformante des sechsten Selektionsschrittes, konnte eine Punktmutation im Penicillin-bindenden Protein 2b innerhalb des bereits im dritten Selektionsschritt ausgetauschten Uo5-Sequenzbereiches als Resistenzdeterminante identifiziert werden. Durch Einbringen von Q₄₀₆P in *S. pneumoniae* R6 konnte das Resistenz vermittelnde Potential dieser Veränderung auch im

1.Zusammenfassung

Wildtyp hintergrund nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Resistenzdeterminante, die über horizontalen Gentransfer auf *S. pneumoniae* übertragen wurde, durch eine sekundäre Mutation, das Resistenzniveau ihres Rezipienten weiter steigern kann.

2. Einleitung

2.1 Die Gattung *Streptococcus*

Streptokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Milchsäurebakterien mit niedrigem GC-Gehalt (ca. 40 %). Innerhalb der Abteilung Firmicutes, werden sie der Klasse der Bacilli zugeordnet. Sie zeichnen sich durch eine kugelförmige bis ovoide Zellform mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 μm aus. Meist treten sie in Paaren oder unterschiedlich langen Ketten auf, sind unbeweglich und nichtsporulierend. Das Hauptprodukt ihres homofermentativen Stoffwechsels stellt die Milchsäure dar. Streptokokken haben sehr komplexe Nährstoffansprüche. Neben einer Kohlenstoffquelle sind Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine und Vitamine zur Kultivierung im Flüssigmedium notwendig. Für das Wachstum auf Festmedium wird zusätzlich eine native Eiweißquelle z.B. in Form von Blut oder Serum benötigt (Hardie und Whiley, 1995).

Die Gattung *Streptococcus* beherbergt eine Vielzahl von heterogenen Arten, deren natürliches Habitat der menschliche Körper darstellt. Bevorzugt werden die Schleimhäute des Nasen- und Rachenraumes, sowie die oberen Atemwege besiedelt. Viele Streptokokken, wie *S. mitis* und *S. oralis* sind als Kommensale Teil der Normalflora. Zu den humanpathogenen Streptokokken zählen unter anderem *S. pneumoniae* und *S. pyogenes*.

Aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der Gattung *Streptococcus* gestaltet sich eine Klassifizierung schwierig. Eines der wichtigsten Klassifizierungsmerkmale stellt das Hämolyseverhalten auf Blutagar dar. Drei unterschiedliche Hämolysevarianten werden dabei unterschieden: Während bei der γ -Hämolyse jegliche Hämolyseaktivität fehlt, werden bei der β -Hämolyse, auch als vollständige Hämolyse bezeichnet, die Erythrozyten gänzlich zerstört, was zur Bildung eines klaren Lysehofs führt. Bei der α -Hämolyse kommt es zur Reduktion des Hämoglobins der Erythrozyten, es entsteht ein grünlicher Hof rund um die Bakterienkolonie. Ein solches Hämolyseverhalten ist unter anderem für *S. mitis*, *S. oralis* und *S. pneumoniae* charakteristisch.

2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae wurde 1881 von Sternberg und Pasteur unabhängig voneinander entdeckt und aufgrund seines häufig auftretenden paarweisen Wachstums zunächst als *Diplococcus pneumoniae* benannt (Sternberg 1881, Pasteur 1881).

Zu großer Bedeutung in der Molekularbiologie gelangte *S. pneumoniae* durch die Experimente des britischen Bakteriologen Frederick Griffith (Griffith, 1928). Griffith injizierte tote, bekapselte Pneumokokken zusammen mit lebenden unbekapselten und somit avirulente Stämmen in Mäuse, die daraufhin verstarben. Aus ihrem Blut konnten lebende, bekapselte Streptokokken isoliert werden. So konnte Griffith zeigen, dass eine „Substanz“ aus den toten bekapselten Pneumokokken auf die unbekapselten Stämme übertragen werden konnte, die diesen die Kapselbildung ermöglichte. 1944 gelang es Oswald Avery in Zusammenarbeit mit Colin Macleod und Macly McCarty zu zeigen, dass es sich bei dieser übertragenen Substanz um DNA handelt (Avery *et al.*, 1944). Damit schufen sie das Fundament für viele weitere Arbeiten in der Molekularbiologie.

Das hohe Pathogenitätspotential von *S. pneumoniae* war bereits bei seiner Entdeckung Ende des 19. Jahrhunderts bekannt (Sternberg, 1881, Pasteur, 1881). Heute zählt *S. pneumoniae* mit jährlich mehr als einer Million Todesfällen weltweit zu den bedeutendsten Krankheitserregern (Attali *et al.*, 2008). Eine Besiedlung durch *S. pneumoniae* verläuft häufig symptomlos. Liegt allerdings ein geschwächtes oder noch nicht vollständig ausgebildetes Immunsystem vor, kann *S. pneumoniae* als opportunistischer Krankheitserreger Erkrankungen wie Lungenentzündung, Mittelohrentzündung oder Meningitis verursachen (Mitchell, 2003). Eine Fülle von Virulenzfaktoren ist daran beteiligt. Der Bedeutendste ist die Polysaccharidkapsel, die das Bakterium vor der Phagozytose durch Makrophagen schützt. Daneben spielen auch das Cholinbinde Protein A, welches der Anheftung an die Wirtszellen dient oder auch das an der Lyse und somit an der Freisetzung von Virulenzfaktoren beteiligte Autolysin LytA eine wichtige Rolle (Jedrzejewski, 2001).

2.1.2 *Streptococcus oralis*

Den oralen Streptokokken der Mitis-Gruppe gehört neben *S. pneumoniae* und *S. mitis* auch *S. oralis* an (Kilpper-Bälz *et al.* 1985; Kilian *et al.*, 1989). Der Name *S. oralis* wurde zum ersten Mal von Bridge und Sneath zur Beschreibung eines Clusters von oralen Streptokokken verwendet (Bridge und Sneath, 1983). *S. oralis* besiedelt als Kommensaler die oberen Atemwege des Menschen (Kilian, 2008). Bei einem geschwächten Immunsystem kann er als opportunistischer Krankheitserreger

2. Einleitung

fungieren und eine Endokarditis auslösen. Er wächst in langen Ketten und sein GC-Gehalt bewegt sich zwischen 38 und 42 % (Hardie und Whiley, 1995; Whiley und Beighton, 1998).

Das Verwandtschaftsverhältnis innerhalb der Streptokokken wurde 2007 von Chi *et al.*, mittels MLST (multi locus sequence typing)-Analysen untersucht. Es zeigte sich, dass *S. mitis* sehr eng mit *S. pneumoniae* verwandt ist, während *S. oralis* einen entfernteren Verwandten von *S. pneumoniae* darstellt (Chi *et al.*, 2007). Denapaita *et al.* gehen sogar davon aus, dass *S. pneumoniae* ein Klon von *S. mitis* ist (Denapaita *et al.*, 2010).

Als erste und bisher einzige vollständige *S. oralis*-Sequenz wurde 2011 die Genomsequenz von *S. oralis* Uo5 veröffentlicht (Reichmann *et al.*, 2011). Bei *S. oralis* Uo5 handelt es sich um einen multiresistenten Keim, der Anfang der 90er Jahre in Ungarn isoliert wurde. Erstmals wurde er von Reichmann *et al.* (1997), damals noch als *S. oralis* Hu5 benannt, beschrieben.

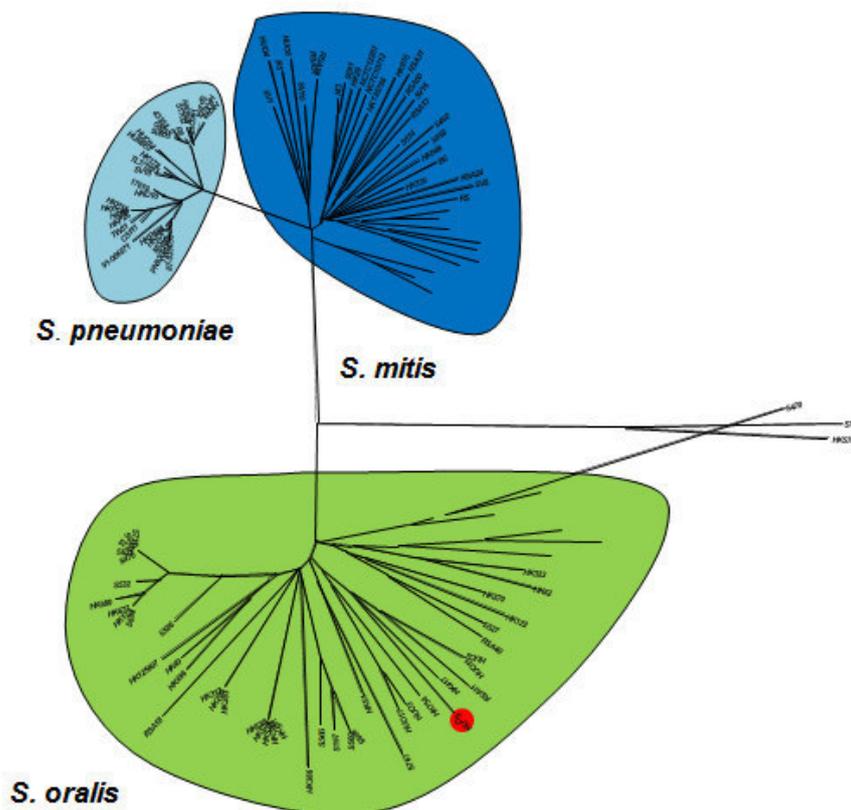


Abbildung 2.1: Phylogenetische Verwandtschaft von *Streptococcus* spp.

Dargestellt ist der phylogenetische Stammbaum der Mitis-Gruppe nach Chi *et al.* (2007). Die Bestimmung des Verwandtschaftsgrades erfolgte mittels MLST-Analysen. Der rote Punkt markiert die Position von *S. oralis* Uo5.

2.2 Die Zellwand von *S. pneumoniae*

2.2.1 Peptidoglykansynthese und Penicillin-bindende Proteine (PBPs)

Die Bakterienzelle ist von einem sackartigen Makromolekül umgeben, dem Peptidoglykan. Es verleiht der Zelle Stabilität, Form und Schutz gegenüber äußeren Einflüssen. Das auch als Murein bezeichnete Makromolekül besteht bei Pneumokokken aus den alternierenden Zuckerderivaten N-Acetylglycosamin (GluNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind.

Die Stabilität des Peptidoglykans wird durch die Quervernetzung zweier Peptidketten erreicht, die an N-Acetylmuraminsäure gebunden sind. Die Zusammensetzung dieses Peptidstammes ist bakterienspezifisch und besteht bei *S. pneumoniae* aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin, und zwei D-Alanin-Molekülen. Die Pentapeptide zweier Mureinstränge können entweder direkt, durch Ausbildung einer Peptidbindung des L-Lysin an Position drei des einen Stanges und des D-Alanin an Position vier des benachbarten Stranges oder indirekt über eine Interpeptidbrücke verbunden werden. Diese besteht bei *S. pneumoniae* entweder aus zwei L-Alaninmolekülen oder aus L-Serin und L-Alanin (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Die Verknüpfung der ersten Aminosäure wird hierbei durch das Enzym MurM katalysiert, die Bindung der zweiten Aminosäure erfolgt über MurN.

Der Vernetzungsgrad variiert in den verschiedenen Pneumokokken-Stämmen beachtlich. Ein stark vernetztes Peptidoglykan konnte bei resistenten Pneumokokken nachgewiesen werden (Garcia-Bustos *et al.*, 1988; Garcia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996, Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000).

Bei der Mureinbiosynthese handelt es sich um einen komplexen Prozess, der in drei Schritte unterteilt werden kann. Diese Teilschritte finden an drei unterschiedlichen Orten der Zelle statt: Im Cytoplasma, an der Cytoplasmamembran und der Zellwand (Vollmer, 2007). Zunächst wird in einer von MurA katalysierten Reaktion ein Enolpyruvatrest auf UDP-N-Acetylglucosamin übertragen und in einer von MurB katalysierten Reaktion zu D-Lactat reduziert: Es entsteht UDP-N-Acetylmuraminsäure. Anschließend werden in einer Reihe von Reaktionen schrittweise Aminosäuren an den Peptidstamm angehängt. Katalysiert werden diese Reaktionen durch die ATP-abhängigen Aminosäure-Ligasen MurC bis MurF. Das so entstehende UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid, wird mit Hilfe von MraY unter Freisetzung von UMP zu dem membrangebundenen Lipidcarrier Undecaprenylpyrophosphat (Bactoprenol) transportiert, Lipid I entsteht. Dieses wird durch eine von MurG katalysierte Reaktion mit UDP-N-Acetylglycosamin zu Lipid II glykosyliert. Gegebenenfalls folgt

2. Einleitung

nun die Anheftung einer Interpeptidbrücke an die Aminogruppe des L-Lysins an Position drei des Pentapeptidstammes. Katalysiert wird die Anheftung der beiden Aminosäuren durch MurM und MurN (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000). Der Peptidoglykanvorläufer, bestehend aus Lipid II und der Interpeptidbrücke, wird darauf hin, wahrscheinlich mittels einer Flippase, über die Membran transportiert. An der Membranaußenseite angekommen, kann er in die wachsende Zellwand eingebaut werden. Bei den Zuckermolekülen geschieht dies durch Transglykosylierung. Für die Quervernetzung der Peptidseitenketten sind Transpeptidasen verantwortlich. Durch die D,D-Carboxypeptidierung wird das endständige D-Alanin abgespaltet und so die Energie für die Quervernetzung geliefert. Die Transglykosylierungs-, Transpeptidierungs- und die D,D-Carboxypeptidierung werden von Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs) katalysiert.

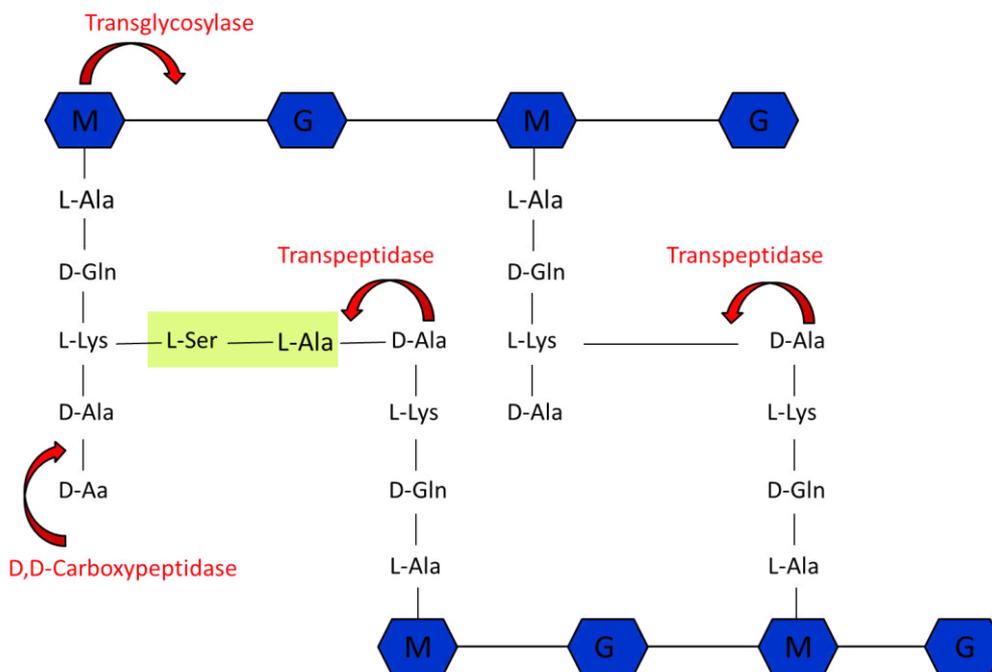


Abbildung 2.2: Peptidoglykanstruktur von *S. pneumoniae*

Schematische Darstellung der Peptidoglykanstruktur von *S. pneumoniae*, sowie die von den PBPs katalysierten Reaktionen. Die Glykanstränge bestehen aus den beiden Zuckerderivaten N-Acetylmuraminsäure (M) und N-Acetylglucosamin (G), die 1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Quervernetzung erfolgt entweder direkt oder indirekt über eine Interpeptidbrücke. Die Interpeptidbrücke ist gelb hinterlegt. Die Anheftung der beiden Aminosäuren wird durch MurM und MurN katalysiert. Die roten Pfeile kennzeichnen die drei PBP-katalysierten Reaktionen.

2.2.1.1 Penicillin-bindende Proteine (PBPs)

PBPs sind membrangebundene Enzyme, die die letzten Schritte der Mureinbiosynthese katalysieren. Die Multidomänenproteine zeichnen sich durch die Anwesenheit einer Penicillin-bindenden Domäne aus. Diese beherbergt die drei konservierte Motive: Die S*XXK, die das aktive Serin enthält (S*), S/YXN und KT(S)G, wobei das X hierbei für eine variable Aminosäure steht. Zusammen mit dem β -Lactamasen, die ebenfalls diese Motive aufweisen, werden die PBPs der Familie der Acyl-Transferasen zugeordnet (Ghuysen, 1991).

Aufgrund ihres Molekulargewichtes werden die PBPs in hochmolekulare (high molecular weight, hmw) und niedermolekulare (low molecular weight, lmw) PBPs unterteilt. Zusätzlich werden die hmw PBPs entsprechend ihrer Enzymeigenschaften in zwei Klassen gegliedert (Goffin und Ghuysen 1998, Goffin und Ghuysen, 2002). Die PBPs der Klasse A besitzen neben ihrer Transpeptidaseaktivität auch eine Transglykosylaseaktivität, während die PBPs der Klasse B als monofunktionale Enzyme nur eine Transpeptidaseaktivität aufweisen. Die lmw-PBPs fungieren, neben ihrer Transpeptidaseaktivität auch als D,D-Carboxypeptidasen. Sie spalten das endständige D-Alanin ab und regulieren so den Grad der Quervernetzung (Severin *et al.*, 1992; Morlot *et al.*, 2004). Während die Membranverankerung der hmw-PBPs über einen N-terminalen hydrophoben Transmembranbereich erfolgt, wird die Membranassoziation der lmw-PBPs über eine C-terminale amphiphile Helix vermittelt.

Alle Bakterien die im Besitz einer Zellwand sind, verfügen über ein charakteristisches Set an PBPs. *S. pneumoniae* besitzt 6 PBPs (Hakenbeck *et al.*, 1986). PBP1a, PBP1b und PBP2a gehören zur Klasse A, PBP2x und PBP2b zur Klasse B der hmw PBPs. PBP3 ist das einzige lmw PBP von *S. pneumoniae*. Da es nicht möglich war PBP2x und PBP2b-Deletionsmutanten herzustellen, wird angenommen, dass diese beiden PBPs für *S. pneumoniae* essentiell sind (Kell *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer Fähigkeit β -Lactame kovalent zu binden, können die PBPs durch Bocillin-Markierung, einem fluoreszierenden Penicillin-V-Derivat, und anschließender Auftrennung über SDS-Page sichtbar gemacht werden (Zhao *et al.*, 1999).

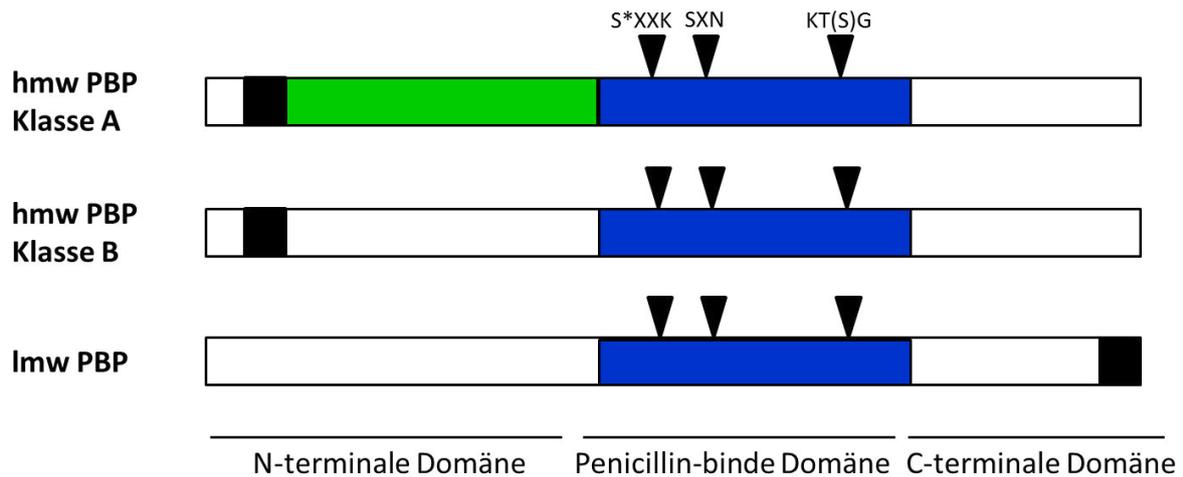


Abbildung 2.3: Die PBPs von *S. pneumoniae*

Gezeigt ist der schematische Aufbau der PBPs von *S. pneumoniae*. Die Domänenstruktur wird durch die verschiedenfarbigen Balken gekennzeichnet. Die Penicillin-bindende Domäne ist in blau dargestellt und beherbergt die drei konservierten Boxen S*XXK, SXN und KT(S)G, abgebildet durch schwarze Dreiecke. X steht für eine variable Aminosäure. Das aktive Serin ist mittels eines Sterns (*) markiert. Die schwarzen Blöcke kennzeichnen den N-terminalen hydrophoben Transmembranbereich der hmw PBPs, sowie die C-terminale amphiphile Helix des lmw PBPs. Die hmw PBPs der Klasse A besitzen in der N-terminalen Domäne Transglykosylase-Aktivität, hier grün gekennzeichnet. Das lmw-PBP besitzt neben seiner Transpeptidase- auch D,D-Carboxypeptidaseaktivität.

hmw: high molecular weight; lmw: low molecular weight

2.2.2 Die Teichonsäuren - Aufbau und Funktion

Die Zellwand von Pneumokokken besteht neben Peptidoglykan aus Teichonsäuren (Mosser und Tomasz, 1970). Diese Makromoleküle setzen sich für gewöhnlich aus Ribitolphosphat- oder Glycerinphosphatpolymeren zusammen und können mit D-Alanin- und, oder unterschiedlichen Glykosylresten substituiert sein (Neuhaus und Baddiley, 2003). Neben ihrer Bindung von divalenten Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) und Oberflächenproteinen (Hughes *et al.*, 1973, Lambert *et al.*, 1975, Briese und Hakenbeck, 1985), beeinflussen die Teichonsäuren auch viele andere Zellwand-assoziierte Prozesse. Hierzu zählen neben der Kompetenz (Tomasz, 1968; Zhang *et al.*, 1999), die Autolyse (Tomasz, 1968; Wecke *et al.*, 1997), die Virulenz (Abachin *et al.*, 2002, Collins *et al.*, 2002), die Biofilmbildung (Gross *et al.*, 2001), sowie die Resistenz gegen antimikrobielle Peptide (Peschel *et al.*, 1999; Kovacs *et al.*, 2006).

Teichonsäuren können entweder kovalent an Peptidoglykan verankert (Wandteichonsäuren, WTA) oder über einen Membrananker mit der Cytoplasmamembran verbunden sein (Lipoteichonsäuren, LTA). Die Teichonsäurefraktion der Zellwand von *S. pneumoniae* besteht zu 90 % aus WTA und zu 10 % aus LTA und unterscheidet sich in mehreren Punkten von der anderer gram-positiver Bakterien

(Mosser und Tomasz, 1970; Vollmer, 2007). So weisen die LTA und WTA von Pneumokokken, eine identische Zusammensetzung auf (Fischer *et al.*, 1993). Auch die chemische Struktur der LTA ist deutlich komplexer. Während die LTA der meisten Grampositiven aus wiederholende Einheiten von Polyglycerinphosphat zusammengesetzt ist (Fischer *et al.*, 1990), so besteht die Repeating Unit bei *S. pneumoniae* aus GalNAc-GalNAc-RitP-Glc-AATGal (Seo *et al.*, 2008). Die Repeating Units können mit bis zu zwei Phosphocholinresten an den beiden GalNAc-Resten substituiert sein (Fischer *et al.*, 1993). Darüber hinaus sind Substitutionen mit D-Alanin und GalNAc beschrieben (Draing *et al.*, 2006).

2.3 β -Lactamresistenz in *S. pneumoniae*

Die Zellwand bietet den Bakterien Stabilität und Schutz vor äußeren Einflüssen. Die Tatsache, dass Peptidoglykan ausschließlich in bakteriellen Zellwänden vorkommt, macht es zu einem beliebten Target für eine Reihe von Antibiotika, darunter auch die β -Lactame.

2.3.1 Die Wirkungsweise der β -Lactamantibiotika

Zur Behandlung von Streptokokken-Infektionen werden häufig β -Lactamantibiotika eingesetzt. Sie wurden 1928 von dem englischen Bakteriologen Alexander Fleming entdeckt und ab den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts therapeutisch eingesetzt. Zur Gruppe der β -Lactamantibiotika gehören neben den Penicillinen auch Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame und β -Lactamaseinhibitoren. Als charakteristisches Merkmal weisen sie einen viergliedrigen β -Lactamring auf. Die Wirkungsweise von β -Lactamen beruht auf der Inhibierung der Mureinbiosynthese, durch Hemmung der Transpeptidierungs- und Carboxypeptidierungsreaktion der PBPs. β -Lactamantibiotika wirken hierbei als Strukturanaloga des D-Ala-D-Ala-Restes des Pentapeptides, dem eigentlichen Substrat der PBPs. Unter Öffnung des β -Lactamrings werden die β -Lactame kovalent an den Hydroxylrest des aktiven Serins innerhalb der Penicillin-bindenden Domäne gebunden. Es entsteht ein enzymatisch inaktiver Enzym-Penicilloyl-Komplex (Tipper und Strominger, 1965). Die Zellwandbildung schreitet kontinuierlich fort, weist aber aufgrund fehlender Quervernetzung eine deutlich verminderte Stabilität auf. Zudem kommt es zur unkontrollierten Freisetzung von Autolysinen, die die bereits existierende Zellwand verdauen und somit zu einem zusätzlichen

Stabilitätsverlust führen (Tomasz, 1979). Die stark geschwächte Zellwand kann dem osmotischen Druck nicht mehr standhalten, die Zelle lysiert.

Die Entdeckung des Penicillins gilt als Meilenstein in der modernen Medizin, doch im Laufe der Evolution haben die Bakterien Strategien entwickelt sich gegen diese Wunderwaffe zu wehren.

2.3.2 PBP-vermittelte β -Lactamresistenz

In *S. pneumoniae* beruht die β -Lactamresistenz vor allem auf der Modifikation der Targetenzyme, den PBPs (Hakenbeck, 1995). In resistenten Pneumokokkenstämmen wurden PBPs gefunden, die ihre Funktionen innerhalb der Zellwandbiosynthese weiterhin ausüben können, aber eine verminderte Affinität gegenüber β -Lactamen aufweisen. Die Hemmung dieser modifizierten PBPs erfordert weitaus höhere Antibiotikakonzentrationen. Bei allen sechs PBPs konnten niederaffine Varianten beobachtet werden. PBP2x und PBP2b stellen hierbei die primären Targets vieler β -Lactamantibiotika dar. Niederaffine Varianten dieser Proteine sind unablässig für die Entwicklung von hochresistenten Stämmen. Zwar führt die Veränderung von einem dieser beiden Proteinen oft nur zu einer geringfügigen Steigerung des Resistenzniveaus, allerdings kann durch ein zusätzlich niederaffines PBP1a, das als sekundäre Resistenzdeterminante fungiert, ein sehr hohes Resistenzlevel erreicht werden (Muñoz *et al.*, 1992; Barcus *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996).

2.3.3 Nicht-PBP Resistenzdeterminanten

Neben der PBP-vermittelten β -Lactamresistenz konnten in Pneumokokken auch PBP-unabhängige Resistenzmechanismen identifiziert werden. Auf vier von ihnen, die Glycosyltransferase CpoA, das Zweikomponentensystem CiaRH, die Aminosäure-Ligase MurE und das an der Bildung der Interpeptidbrücke beteiligte Enzym MurM soll anschließend im Detail eingegangen werden.

2.3.3.1 Die Glycosyltransferase CpoA

In zwei unabhängig voneinander isolierten piperacillinresistenten Labormutanten von *S. pneumoniae* konnten Veränderungen im Gen, das für die Glycosyltransferase CpoA codiert, identifiziert werden. In beiden Fällen führten sie zur Resistenzsteigerung gegen Piperacillin. Die Mutationen gingen mit einer Reduktion der natürlichen Kompetenz und einer verminderten PBP1a (PonA)-Menge einher. Diese beiden Phänotypen führten zur Namensgebung von CpoA (regulator of competence and ponA). Es wird angenommen, dass CpoA eine wichtige Rolle in der Glycolipidsynthese von Pneumokokken einnimmt. Die Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* besteht aus den beiden Glycolipiden Glycosyldiacylglycerin (GlcDAG) und Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin (GalGlcDAG) (Kaufman *et al.*, 1965; Brundish *et al.*, 1965). Sie liegen in einem Verhältnis von 1:2,5 vor (Tatituri *et al.*, 2012). Neben den Glycolipiden besteht die Cytoplasmamembran der Pneumokokken aus den beiden Phospholipiden Cardiolipin (CL) und Phosphatidylglycerin (PG) (Brundish und Baddiley, 1967). CpoA wurde als α -Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin-Synthase beschrieben, die einen Galactosylrest von UDP-Galactose auf GlcDAG überträgt (Berg *et al.*, 2001; Edman *et al.*, 2003), um so GalGlcDAG, das zweite Glycolipid zu bilden.

CpoA befindet sich mit fünf weiteren Genen in einem Operon. Eines dieser Gene, *spr0982* codiert ebenfalls für eine Glycosyltransferase. Sie ist für die Übertragung eines Glycosylrestes von UDP-Glyucose auf Diacylglycerin (DAG) verantwortlich und somit für die Bildung des ersten Glycolipides GlcDAG. Eine schematische Darstellung der Struktur der Membran, sowie die letzten Schritte der Glycolipidsynthese kann der Abbildung 2.4 entnommen werden.

Laut der von Seo *et al.* veröffentlichten Struktur der Lipoteichonsäure (LTA) besteht der Lipidanker bei Pneumokokken aus GlcDAG, dem mengenmäßig geringer vorkommenden Glycolipid der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* (Seo *et al.*, 2008). Passend zur essentiellen Funktion der LTA in Pneumokokken tauchte das zur Synthese des Lipidankers erforderliche Gen *spr0982* in der von Song *et al.* (2005) veröffentlichten Liste der essentiellen Gene dieses Organismus auf.

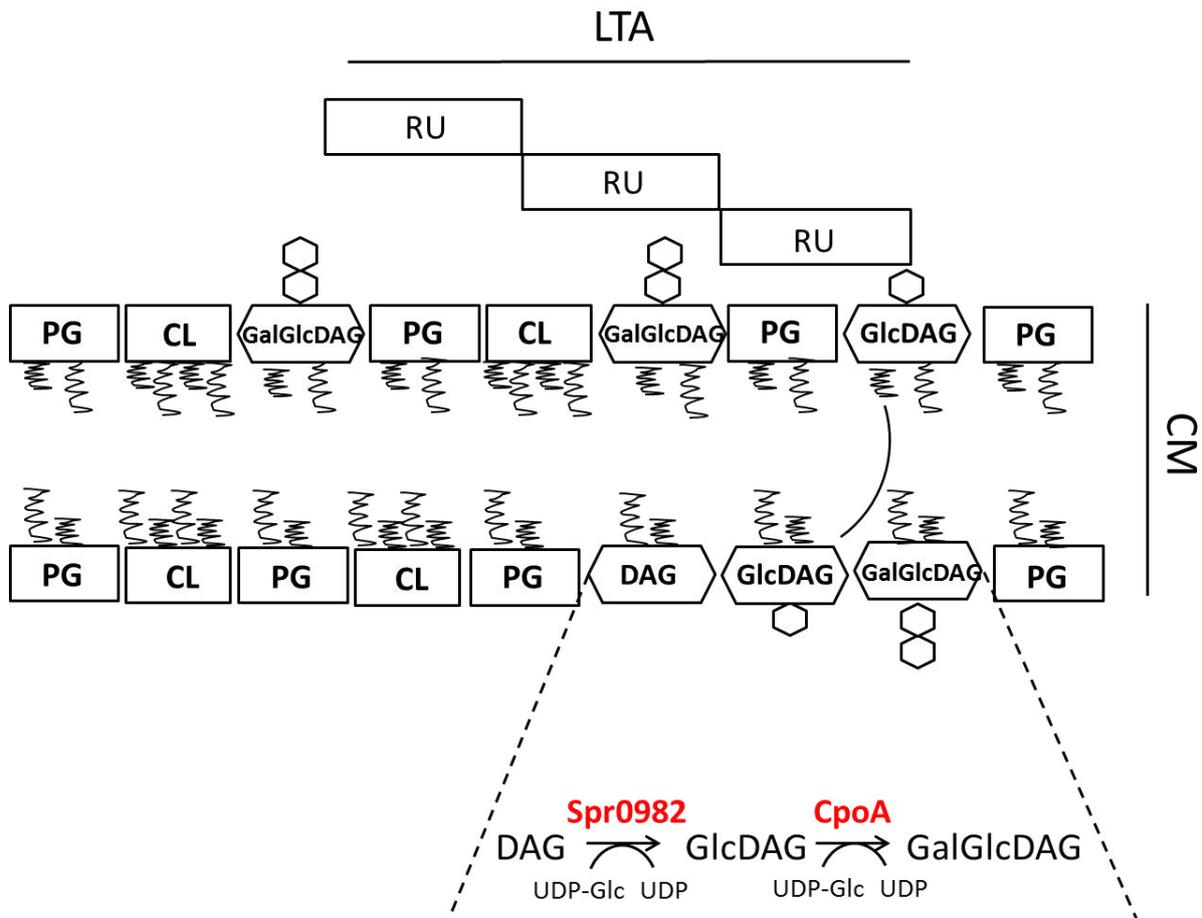


Abbildung 2.4: Model der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* und der Glycolipidsynthese

Schematische Darstellung der Cytoplasmamembran (CM) von *S. pneumoniae* und dem Syntheseweg der beiden Glycolipide. Das Genprodukt von *spr0982* transferiert einen Glycosyl-Rest auf Diacylglycerin (DAG) und bildet Glycosyldiacylglycerin (GlcDAG). CpoA überträgt einen Galactosyl-Rest auf GlcDAG, es entsteht das zweite Glycolipid Galaktosylglycosyldiacylglycerin (GalGlcDAG). GlcDAG stellt den Lipidanker für die Lipoteichonsäure (LTA) dar.

RU: Repeating Unit der Teichonsäure; CL: Cardiolipin; PG: Phosphatidylglycerin

= ungesättigter Fettsäurerest = gesättigter Fettsäurerest

2.3.3.2 Das Zwei-Komponentensystem CiaRH

Als erste nicht PBP-Resistenzdeterminante wurde das Zwei-Komponentensystem CiaRH im Zuge der Untersuchung von cefotaximresistenten Labormutanten identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994).

CiaRH ist eines von insgesamt 13 Zwei-Komponentensystem (TCS) von *S. pneumoniae* (Lange *et al.*, 1999) und entspricht dem Aufbau eines klassischen TCS. Es besteht aus der membranständigen Histidinkinase CiaH und dem cytoplasmatisch lokalisierten Responseregulator CiaR.

2. Einleitung

ciaH und *ciaR* werden gemeinsam als Operon transkribiert. Das upstream liegende *ciaR* und *ciaH* überlappen sich dabei um 8 Basenpaare (Giammarinaro *et al.*, 1999), eine Operonstruktur, die häufig bei TCS beobachtet wird (Laub und Goulian, 2007).

Das CiaRH-System wird mit vielen unterschiedlichen Phänotypen von *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, dass eine stärkere Aktivierung von CiaRH einen Verlust der natürlichen Kompetenz, sowie einem Anstieg der Cefotaximresistenz bewirkt (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 2002). Diese beiden Phänotypen führten zur Namensgebung von CiaRH (competence induction and altered cefotaxime susceptibility). Durch Zugabe des Kompetenz-stimulierenden Peptides (CSP) kann dieser Kompetenzverlust teilweise aufgehoben werden (Zähler *et al.*, 2002). Des Weiteren führt eine Inaktivierung von CiaRH zur Kompetenzentwicklung unter kompetenzinhibierenden Bedingungen. Hierzu zählt neben bestimmten Medien, wie brain heart infusion (BHI), ein niedriger pH-Wert, sowie eine verminderte Sauerstoffkonzentration (Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003).

Zudem konnte gezeigt werden, dass ein aktiviertes CiaRH-System vor der Lyse durch Zellwand-Inhibitoren wie Bacitracin, Piperacillin und Vancomycin schützt, sowie eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Detergenzien (Triton, Desoxycholat) oder Säure vermittelt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008; Moscoso *et al.*, 2010). Dagegen führt die Inaktivierung von CiaRH zur verkürzten Stationärphase und einer vorzeitigen Autolyse (Mascher *et al.*, 2006). Das CiaRH-System wirkt sich auch auf die Virulenz von *S. pneumoniae* aus. So konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des CiaRH-System die Besiedlung des Nasopharynx und der Lunge, sowie den Übergang der Bakterien ins Blut erschwert (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a).

Eine Aktivierung des CiaRH-Systems wird durch Punktmutationen in der Histidinkinase *ciaH* verursacht und als hyperaktiv bezeichnet. Veränderungen in *ciaH* konnten sowohl in Labormutanten, wie auch in klinischen Isolaten beobachtet werden (Müller *et al.*, 2011).

Als Stimulus für CiaH wurden Ca^{2+} - und Phosphat, sowie die O_2 -Konzentration diskutiert (Echenique *et al.*, 2000; Giammarinaro *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass Zellwandspezifische Antibiotika wie Vancomycin und Penicillin zu einer Aktivierung von CiaRH führen (Zähler *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass die durch Antibiotikazugabe verursachte Schädigung der Zellhülle als Signal für CiaH fungieren kann (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2007). Ein direkter Stimulus konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Außerdem ist unklar, wie sich der Stimulus auf CiaH auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass CiaH bifunktional ist, somit Phosphatase- sowie Kinaseaktivität besitzt. Zudem kann phosphoryliertes CiaR auch in Abwesenheit der Kinase beobachtet werden (Halfmann *et al.*, 2011).

2. Einleitung

Als alternative Phosphatquelle für CiaR wurde die energiereiche Verbindung Acetylphosphat diskutiert (Lukat *et al.*, 1992; Wanner, 1992; Wolfe, 2010; Marx *et al.*, 2015).

Die Histidinkinase CiaH besteht aus zwei putativen Transmembrandomänen zwischen denen sich eine extrazelluläre Domäne befindet, die möglicherweise als Sensor fungiert. C-Terminal schließt sich ein cytoplasmatisch lokalisierter Bereich an, der eine DHp- und CA-Domäne aufweist und den konservierten Histidinrest an Position 226 trägt. Der Responseregulator CiaR befindet sich im Cytoplasma und fungiert als Transkriptionsregulator. Er besteht aus einer Receiver Domäne (RD), die das konservierte Aspartat enthält und einer Effektor Domäne (ED). Durch Wahrnehmung eines Signals durch die Sensor Domäne (SD) von CiaH kommt es zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes in der cytoplasmatischen Kinasedomäne (KD) von CiaH. Das energiereiche Phosphat wird auf das konservierte Aspartat der Receiver Domäne (RD) von CiaR transferiert, was zur Konformationsänderung der Effektor Domäne (ED) führt. Durch Bindung an eine Erkennungssequenz steuert der so aktivierte Responseregulator die Expression mehrerer Gene. Das Bindemotiv von CiaR wurde von Halfmann *et al.* identifiziert. Es handelt sich dabei um einen direkten Repeat mit der Konsensussequenz TTTAAG-N5-TTTAAG, der sich meist 10 bp upstream der -10 Region befindet (Halfman *et al.*, 2007b).

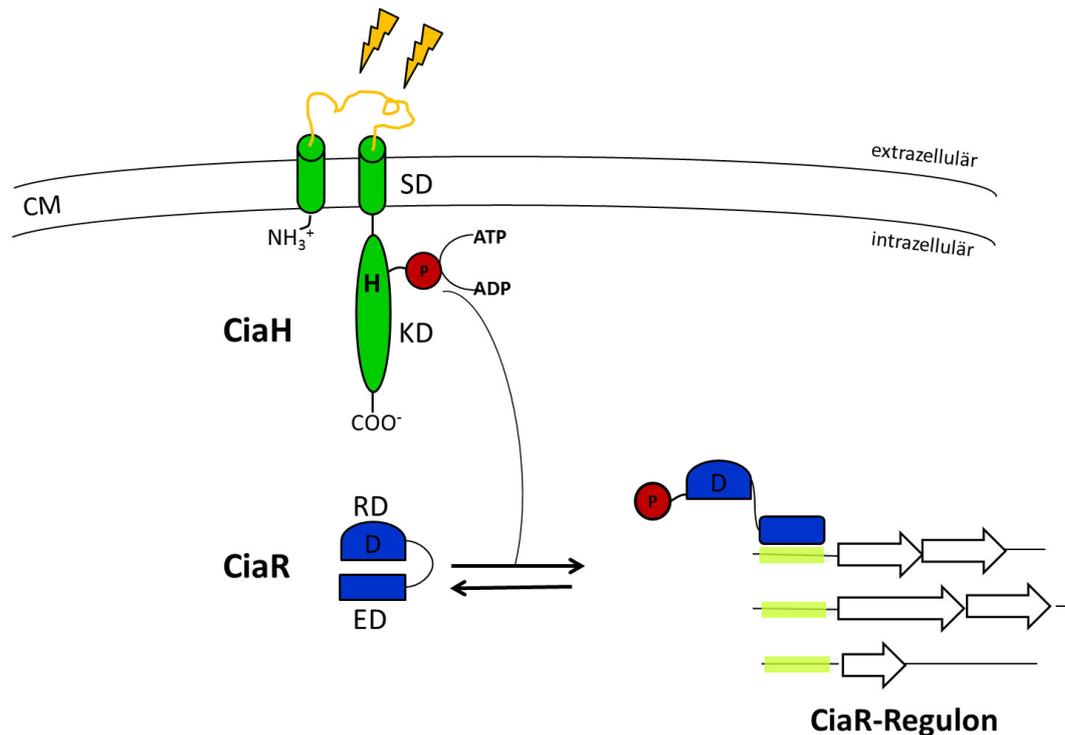


Abbildung 2.5: Signaltransduktion des Zweikomponentensystems CiaRH

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Signaltransduktion von CiaRH. Durch Wahrnehmung eines Signals der Sensor Domäne (SD) von CiaH, kommt es zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung des Histidinrestes in der Kinasedomäne (KD) von CiaH. Das Phosphat wird auf das konservierte Aspartat (D) der Receiver Domäne (RD) von CiaR übertragen, was zur Konformationsänderung der Effektor Domäne (ED) führt. Der so aktivierte Responserregulator steuert die Expression mehrerer Gene durch Bindung der Effektor Domäne an eine spezifische Sequenz innerhalb des Promotorbereiches. CM: Cytoplasmamembran

Es konnten 16 Promotoren identifiziert werden, die direkt durch CiaR reguliert werden und die Expression von 29 Genen steuern. Von den 16 Promotoren werden 15 positiv und einer negativ reguliert (Halfmann *et al.*, 2007b; Denapaité *et al.*, 2012). Zu den am stärksten von CiaR abhängigen Genen gehören neben den Promotoren der fünf kleinen RNAs, *parB* und *spr0931* auch *htrA*. *HtrA* codiert für die Serinprotease HtrA (high temperature requirement A), die der Familie der Hitzeschock induzierten trypsinähnlichen Serinproteasen angehört. Die Familie dieser Serinproteasen ist weit verbreitet und kommt neben Prokaryonten auch bei Pflanzen und Säugetieren vor. Allen gemein ist eine protolytische Aktivität (Kim und Kim; 2005). Diese Proteasen, die häufig extrazellulär lokalisiert sind, spielen eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle. Im Gegensatz zu anderen, ebenfalls an der Qualitätskontrolle mitwirkenden Proteasen, wie ClpXP und ClpAP, handelt es sich bei HtrA um eine ATP-unabhängige Protease (Kim und Kim, 2005). Allen HtrA-Proteasen ist ein ähnlicher Aufbau gemein. Auf einen kurzen N-terminalen Bereich, der als Signalpeptid oder Membrananker fungieren kann, folgt die Proteasedomäne und eine oder mehrere PDZ-Domänen (post-synaptic-density protein, disc large, zo-1 protein). Die Proteasedomäne beherbergt die drei konservierten, katalytisch

2. Einleitung

aktiven Aminosäuren, Histidin, Serin und Aspartat (Skorko-Glonek *et al.*, 1995). Die Anzahl, der sich C-Terminus befindlichen PDZ-Domänen variiert. Während bei gram-positiven Bakterien wie *S. pneumoniae* meist nur eine identifiziert werden kann, so besitzen viele HtrA-Homologe gram-negativer Organismen zwei PDZ-Domänen (Jones *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass die PDZ-Domänen bei der Substratbindung von HtrA eine Rolle spielen.

HtrA liegt in *S. pneumoniae* extracellulär, aber membranassoziiert vor und ist an der Virulenz, der Kompetenz, der Bacteriocinproduktion, sowie dem Wachstum unter Stressbedingungen beteiligt (Sebert *et al.*, 2005; Dawid *et al.* 2009; Ibrahim *et al.*, 2004b). Der Einfluss von HtrA auf die Kompetenz ist widersprüchlich. Zum einen konnte gezeigt werden, dass der durch Hyperaktivierung des CiaRH-System verursachte Verlust der Transformierbarkeit, durch Inaktivierung von HtrA teilweise wieder aufgehoben werden kann (Sebert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2011), zum anderen konnte Ibrahim *et al.* (2004b) einen aktivierenden Effekt von HtrA auf die Kompetenz beobachten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HtrA CSP abbaut und sich dadurch negativ auf die Kompetenzentstehung auswirkt (Cassone *et al.*, 2012). Der Abbau von CSP durch HtrA kann durch die Anwesenheit falsch oder unvollständig gefalteter Proteine herabgesetzt werden, was darauf schließen lässt, dass HtrA fehlerhaft gefaltete Proteine als Substrat erkennt. Zudem übt HtrA auch Einfluss auf die Virulenz aus. In den pathogenen *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und TIGR4 kam es durch die Deletion von *htrA* im Mausmodell zu einem vollständigen bzw. starken Virulenzverlust, sowie einem verlangsamten Wachstum bei erhöhten Temperaturen (40 °C) und einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativen Stress (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b).

2.3.3.3 Die Aminoacyl-Ligase MurM

MurM ist neben CiaH die einzige nicht PBP-Resistenzdeterminante, die in klinischen Isolaten identifiziert werden konnte. *MurM* befindet sich zusammen mit *murN* in einem Operon und katalysiert die Anheftung der ersten Aminosäure an die Interpeptidbrücke (Filipe und Tomasz, 2000; Smith und Klugman, 2001). Die in klinischen Isolaten identifizierten *murM*-Gene besitzen eine Mosaikstruktur und treten zusammen mit niederaffinen PBPs auf (Smith und Klugman, 2001; Filipe *et al.*, 2001; Cafini *et al.*, 2006). Die Inaktivierung von *murM*, sowie des kompletten *murMN*-Operon in hochresistenten Pneumokokken führt zur Abnahme der verzweigten Peptide und zum Resistenzverlust, auch in Anwesenheit niederaffiner PBPs (Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000).

2.3.3.4 Die Aminosäureligase MurE

Das Enzym MurE gehört der Familie der Mur-Ligasen an und katalysiert in gram-positiven Bakterien die ATP-abhängige Anheftung von L-Lysin (L-Lys) an die wachsende Peptidkette im Zuge der Peptidoglykanbiosynthese (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1994; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1999). Über ihre Aminogruppe ist L-Lys an der Bildung der Quervernetzung zweier Peptidketten beteiligt und nimmt so eine zentrale Rolle in der Stabilität der Zellwand ein (Strancar *et al.*, 2007).

Einen Zusammenhang von MurE und der β -Lactamresistenz lieferten Gardete *et al.*, 2004. Sie konnten zeigen, dass MurE eine wichtige Rolle in der Oxacillin Resistenz von *S. aureus* spielt. In dem Methicillin-resistenten *S.aureus*-Isolat (MRSA), der für diese Studie verwendet wurde, führte Transposon-Insertion in *murE* zu einem Abfall der Resistenz.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Todorova *et al.* (2015) wurde eine weitere Beteiligung von MurE an der β -Lactamresistenz diskutiert. Sie konnten zeigen, dass im Zuge des Horizontalen Gentransfers das *murE*-Gen eines resistenten *S. oralis* Isolats auf einen sensitiven *S. pneumoniae*-Stamm übertragen wurde und dort zu einer Steigerung der β -Lactamresistenz führte. Besonders ausgeprägt war dieser Resistenzanstieg in Kombination mit niederaffinen PBPs.

2.4 Entstehung und Verbreitung der β -Lactamresistenz

Bei der Entstehung und Verbreitung von β -Lactamresistenzen spielen sowohl der Gentransfer innerhalb einer Art (intra- Spezies), als auch zwischen Stämmen verschiedener Arten (inter-Spezies) eine zentrale Rolle. Hierzu unablässig ist die Fähigkeit fremde DNA aufzunehmen und sie in das eigene Genom zu integrieren. Der Gentransfer zwischen Bakterien wurde erstmals 1928 von Frederick Griffith beschrieben (Griffith, 1928). Heute ist er unter dem Prinzip der bakteriellen Transformation bekannt und ein unablässiges Werkzeug bei der Verbreitung von β -Lactamresistenzen.

2.4.1 Natürliche Kompetenz in *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein natürlich kompetentes Bakterium. Die Fähigkeit exogene DNA aufzunehmen ist Medien abhängig und erstreckt sich meist über die gesamte exponentielle Wachstumsphase und endet mit dem Eintritt in die Stationärphase. Bei der Kompetenzentwicklung spielen auch Parameter

2. Einleitung

wie der pH-Wert, die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur eine Rolle (Tomasz und Hotchkiss, 1964; Chen und Morrison, 1987; Echenique *et al.*, 2000).

Die Regulation der Kompetenz erfolgt in *S. pneumoniae* über ein Quorum-Sensing-System (Abbildung 1.6). Als Induktor für die Kompetenz fungiert das Peptidpheromon CSP. Dieses wird zunächst als Vorläufer Peptid (prä-CSP) von *comC* codiert und durch den ABC-Transporter ComAB prozessiert und exportiert (Håvarstein *et al.*, 1995; Hui *et al.*, 1995). Das N-terminale Leader-Peptid wird hierbei abgespalten und das 17 Aminosäuren lange fertige CSP in die Umgebung abgegeben, wo es sich ansammelt und mit dem Zwei-Komponentensystem ComDE interagiert. Beim Überschreiten eines Schwellenwertes kommt es zur Kompetenzinduktion (Håvarstein *et al.*, 1995; Pestova *et al.*, 1996). Hierbei wird die Histidinkinase ComD durch Binden von CSP stimuliert und autophosphoryliert. Der Phosphatrest wird auf den Responseregulator ComE übertragen. Der so aktivierte Responseregulator steuert die Expression der „frühen“ Kompetenzgene durch Bindung einer Repeat-Sequenz innerhalb des Promotorbereiches. Hierzu zählen neben *comCDE* selbst, auch die Gene, die für den ABC-Transporter ComAB codieren (Ween *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2004). Darüber hinaus befinden sich in diesem Regulon die Gene *comX1* und *comX2*. Sie codieren für den alternativen Sigmafaktor ComX. Dieser induziert die „späten“ Kompetenzgene, die für die Aufnahme der DNA, Prozessierung und die Integration verantwortlich sind (Peterson *et al.*, 2004; Claverys *et al.*, 2009). Unter den „späten“ Kompetenzgenen finden sich auch Proteine, die bei der lytischen Aktivität oder der Immunität eine Rolle spielen. Neben *lytA*, welches für das Hauptautolysin von *S. pneumoniae* codiert, finden sich auch die Gene *cbpD* und *cibAB*, die für eine Mureinhydrolase und ein Zwei-Peptid Bacteriocin codieren. Diese Gene wurden als bedeutsam für die Allosyse, den sogenannten „Brudermord“ beschrieben (Guiral *et al.*, 2005; Kausmally *et al.*, 2005; Håvarstein *et al.*, 2006). Darunter versteht man die Lyse nicht kompetenter Zellen durch kompetente Zellen (Steinmoen *et al.*, 2003). Die kompetenten Zellen selbst werden dabei durch die Immunitätsproteine ComM, welches durch ein frühes Kompetenzgen und CibC, welches durch ein spätes Kompetenzgen codiert wird und zusammen mit *cibAB* in einem Operon liegt, geschützt. Das Kompetenzregulon beherbergt noch eine Vielzahl weiterer Gene. In zwei Transkriptionsstudien konnten 124 bzw. 105 Gene identifiziert werden, die durch Zugabe von CSP induziert werden (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004), darunter auch Gene unbekannter Funktion. Von den 91 Genen, die auf beiden Listen auftauchten, gehörten 17 den „frühen“ und den 60 „späten“ Kompetenzgenen an (Claverys *et al.*, 2006).

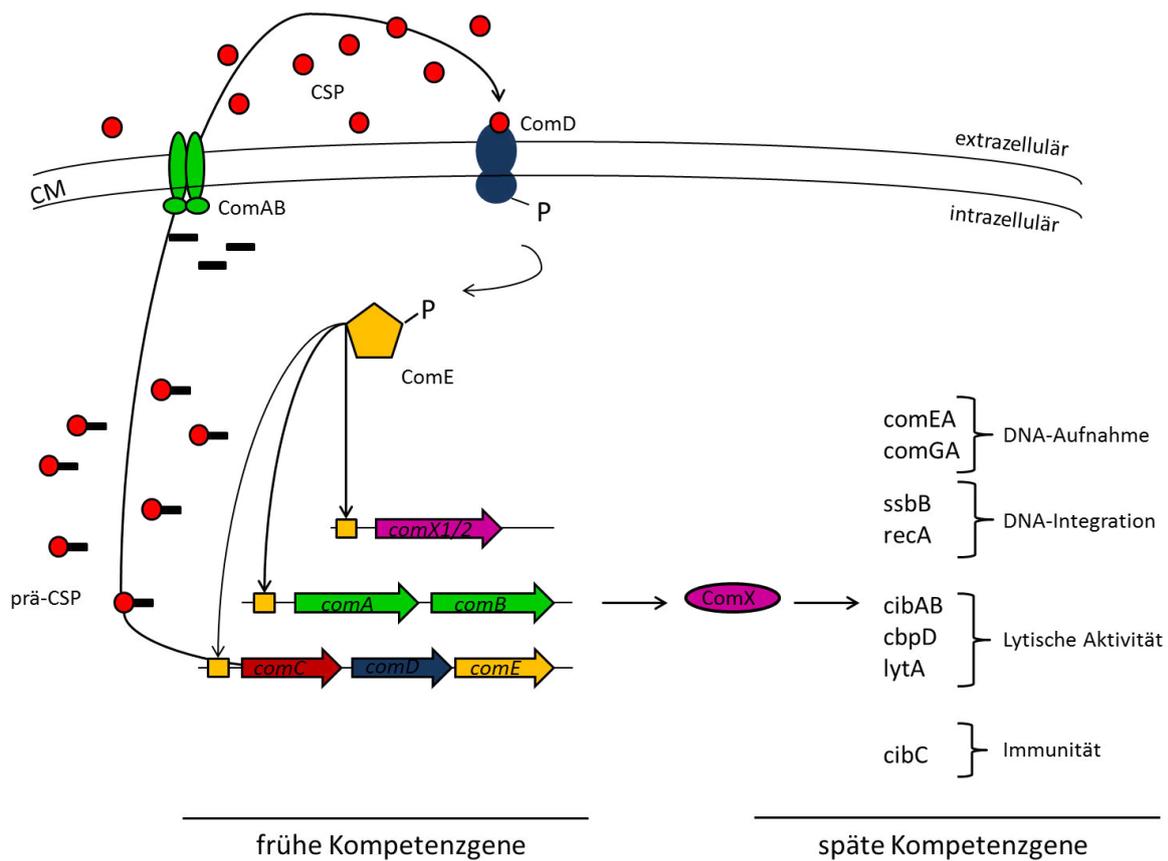


Abbildung 2.6: Regulation der Kompetenz in *S. pneumoniae*

Gezeigt ist schematisch die Regulation der Kompetenz in *S. pneumoniae*. Das Vorläufer-CSP (Prä-CSP) wird durch ComAB prozessiert und anschließend in die Umgebung abgegeben. CSP bindet an ComD, es kommt zur Autophosphorylierung der Histidinkinase. Durch Übertragung des Phosphatrestes auf ComE wird dieser aktiviert und induziert die Expression der frühen Kompetenzgene. Darunter auch *comX*, welches für einen alternativen Sigmafaktor codiert und die Expression der späten Kompetenzgene steuert. CM: Cytoplasmamembran; CSP: Competence stimulating peptide; ComAB: ABC-Transporter; ComD: Histidinkinase; ComE: Responseregulator; ComX: Alternativer Sigmafaktor

2.4.2 Horizontaler Gentransfer

In resistenten klinischen Pneumokokkenisolaten wurden *pbp*-Gene identifiziert, die Sequenzabschnitte besitzen, die sich von denen sensibler Stämme unterscheiden. Man geht davon aus, dass solche Mosaikgene durch den Gentransfer von kommensalen Streptokokken wie *S. mitis* oder *S. oralis* auf *S. pneumoniae* entstanden sind. Gestützt wird diese Annahme durch den Fund von PBP-Mosaikblöcken in kommensalen Streptokokken-Isolaten (Chalkley *et al.*, 1991; Dowson *et al.*, 1990; Dowson *et al.*, 1993; Sibold *et al.*, 1994; Potgieter und Chalkley., 1995; Reichmann *et al.*, 1997). Die Anwesenheit von identischen PBP-Mosaikblöcken in unterschiedlichen *S. pneumoniae*-Stämmen, lässt auch auf eine Übertragung von Resistenzdeterminanten innerhalb einer Art schließen (Coffey *et al.*, 1991; Muñoz *et al.*, 1991).

2. Einleitung

Die Sequenzähnlichkeit, die die PBP-Gene von sensitiven und resistenten Kommensalen aufweisen, legt nahe, dass die Resistenz durch die Häufung spontaner Punktmutationen, infolge des Selektionsdruckes durch Antibiotika, entstanden ist (Dowson *et al.*, 1993; Hakenbeck *et al.*, 1999; Sibold *et al.*, 1994). Die Übertragung dieser veränderten Sequenzblöcke verleiht sensitiven Pneumokokkenisolaten Resistenz. Durch sekundäre Punktmutationen kann das Resistenzniveau zusätzlich gesteigert werden.

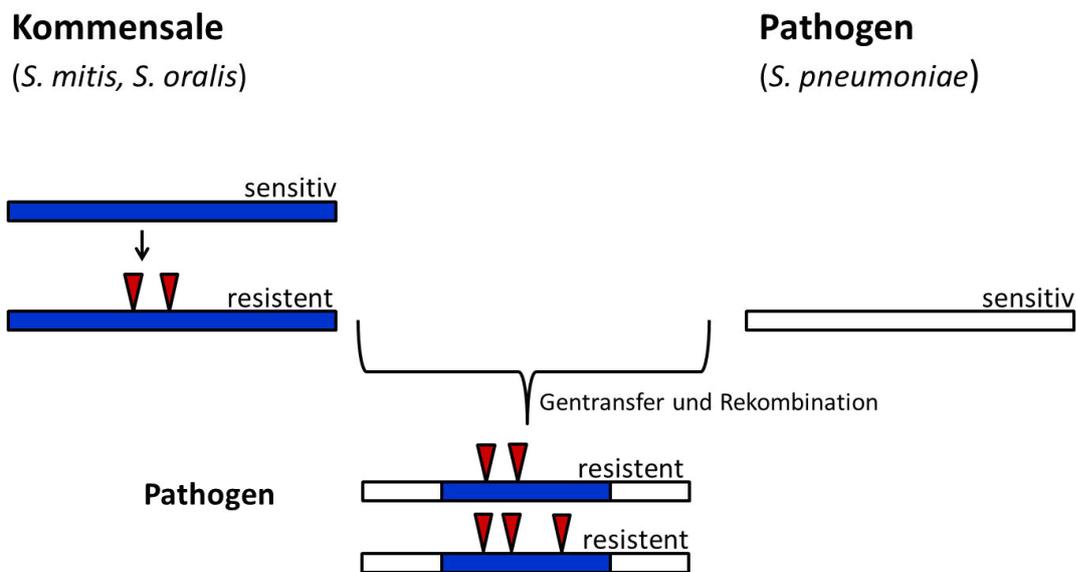


Abbildung 2.7: Modell zur Entstehung der Resistenz in *S. pneumoniae*

Die *pbp*-Sequenzen sensitiver Streptokokken sind als weiße Balken dargestellt, die blauen Balken symbolisieren die homologen Gene kommensaler Streptokokken. Die roten Pfeile repräsentieren die Punktmutationen. Durch Anhäufung von Punktmutationen entstehen innerhalb der Kommensalen resistente *pbp*-Gene, die über horizontalen Gentransfer auf sensitive Pathogene wie *S. pneumoniae* übertragen werden können. Dieser Transfer resultiert in Mosaikgenen, die den sensitiven Pneumokokken Resistenz verleihen. Durch Punktmutationen kann das Resistenzniveau zusätzlich gesteigert werden.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Eines der Hauptinteressen dieser Arbeit stellte die Charakterisierung einer von Grebe *et al.*, (1997) in den Labormutanten P104 und P106 identifizierte Resistenzdeterminante, die Glycosyltransferase CpoA, dar. Durch die Bestimmung des Translationsstartpunktes von CpoA, sollte die Position der Veränderungen in den Labormutanten, sowie die daraus resultierenden Folgen konkretisiert werden. Des Weiteren sollte sich mit den Auswirkungen dieser Veränderungen befasst werden. Neben der Darstellung der Membranlipide und der phänotypischen Charakterisierung, sollten globale Transkriptomanalysen der *cpoA*-Mutanten durchgeführt und mit denen des Parentalstamms R6 verglichen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des horizontalen Gentransfers zwischen den *S. pneumoniae* und *S. oralis*. Als Grundlage für diese Arbeit diente ein von Todorova (2010) durchgeführtes Transformationsexperiment, indem der sensitive *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA des hochresistenten *S. oralis* Uo5 transformiert wurde. In sechs Transformationsschritten mit sukzessiv gesteigerter Antibiotikakonzentration, konnten sechs Transformanten generiert werden, die sich durch eine stufenweise erhöhte Resistenz auszeichnen. Durch die Arbeiten von Todorova *et al.* (2015), konnte gezeigt werden, dass drei niederaffine PBPs, sowie die Aminosäureligase MurE den Resistenzanstieg der ersten drei Selektionsschritte vermitteln. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche Gene in den Selektionsstufen vier, fünf und sechs von Uo5 auf R6 übertragen wurden und für den Anstieg des Resistenzniveaus verantwortlich sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

In der Tabelle 3.1 sind die Bakterienstämme aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden bzw. als Ausgangsstämme der in dieser Arbeit hergestellten Stämme dienten. Der Tabelle 3.2 können die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten Bakterienstämme entnommen werden.

Tabelle 3.1: Verwendete Bakterienstämme

RKL-Nr.	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>subE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 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>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	Wildtyp, kapselfrei, kompetent	Ottolenghi und Hotchkiss, 1962
	<i>Streptococcus oralis</i> Uo5	Ungarisches Isolat aus nasalem Abstrich, β -Lactam ^R	Reichmann <i>et al.</i> , 1997 (hier Hu5 genannt)
	AmiA9	<i>rpsL</i>	Sicard, 1964; Salles, 1962
	P104	<i>cpoA</i>	Laible und Hakenbeck.,; Grebe <i>et al.</i> , 1997
	P106	<i>cpoA</i>	Laible und Hakenbeck., 1987; Grebe <i>et al.</i> , 1997
	R6 Δ <i>cpoA</i>	Janus-Kassette in <i>cpoA</i> , <i>rpsL</i> Sm ^S , Kan ^R	Volz, 2008; Meiers <i>et al.</i> , 2014
	R6_ P _{<i>cpoA</i>} -ATG _{1,2}	R6 <i>bgaA::tetM</i> -P _{<i>cpoA</i>} -ATG _{1,2} - <i>lacZ</i>	Eisel, 2008; Meiers <i>et al.</i> , 2014

RKL-Nr.	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
	R6 <i>ciaH::aad9</i>	<i>ciaH::aad9</i> Spec ^R	Zähner, 1999
RKL 508	R6 pPP2 <i>comX</i>	<i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>	Kaysen, 2012
	R6 <i>htrA::apHIII</i>	<i>htrA::apHIII</i> , Kan ^R	Schäfer, 2007
RKL 559	R6 pTEXpPP2 _{<i>htrA</i>} <i>ciaH202</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202-spr0568</i>	Huber, 2012
RKL43	R6 pPP2 <i>htrA</i>	<i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	Halfmann, 2008
	P20	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5}	Todorova <i>et al.</i> , 2015
	PC	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5}	Todorova <i>et al.</i> , 2015
	PCP	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6}	Todorova <i>et al.</i> , 2015
	PCPC	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i>	Todorova, 2010; diese Arbeit
	PCPCC	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i> , <i>htrA Δ333-342</i>	Todorova, 2010; diese Arbeit
	PCPCCO	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i> , <i>htrA Δ333-342</i> , <i>pbp2b a1217c</i>	Todorova, 2010; diese Arbeit
	R6Δ <i>spr1992</i>	<i>spr1992::apHIII</i>	König, 2013
	<i>S. pneumoniae</i> RK1	<i>ccnA::ermAM</i>	Kovács, 2009

Tabelle 3.2: Hergestellte Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
R6_ P _{cpoA} -ATG ₁ ,	R6 <i>bgaA::tetM-P_{cpoA-ATG1}-lacZ</i>	diese Arbeit
R6_ P _{cpoA} -ATG ₁ ,ATA ₂	R6 <i>bgaA::tetM-P_{cpoA-ATG1,ATA2}-lacZ</i>	diese Arbeit
P104 pPP2 <i>htrA</i>	P104 <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	diese Arbeit
P106 pPP2 <i>htrA</i>	P106 <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>cpoA</i> pPP2 <i>htrA</i>	R6Δ <i>cpoA bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	diese Arbeit
PCCCOPPP2 _{<i>htrA</i>}	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i> , <i>htrA</i> Δ333-342, <i>pbp2b a1217c</i> ; <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH773</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
R6 pTEX <i>ciaH202</i> Δ <i>htrA</i>	RKL 559 <i>htrA::apHIII</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH773</i> Δ <i>htrA</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i> , <i>htrA::apHIII</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaHR6</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>comX</i>} pTEX <i>ciaHR6</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{comX}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>cib</i>} pTEX <i>ciaHR6</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{cib}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>comX</i>} pTEX <i>ciaH773</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{comX}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
R6Δ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>cib</i>} pTEX <i>ciaH773</i>	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{cib}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH773</i>	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i> <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> pPP2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaHR6</i>	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH c773a</i> <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ</i> , <i>bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit

3 Material und Methoden

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
PCPCCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH</i> 73	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ333-342 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH</i> 73Δ <i>htrA</i>	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ333-342 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>htrA</i>} pTEX <i>ciaH</i> 773	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{htrA}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>comX</i>} pTEX <i>ciaH</i> 73	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{comX}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>cib</i>} pTEX <i>ciaH</i> 773	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{cib}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>comX</i>} pTEX <i>ciaHR</i> 6	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{comX}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>cib</i>} pTEX <i>ciaHR</i> 6	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{cib}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaHR6-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>comX</i>} pTEX <i>ciaH</i> 773	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ333-342 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{comX}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCCΔ <i>ciaH</i> ppp2 _{<i>cib</i>} pTEX <i>ciaH</i> 73	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ333-342 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-P_{cib}- lacZ,bgA tmp-P_{tet}-ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit

3 Material und Methoden

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
PCPCCO Δ ciaHppP2 _{comX} pTEXciaH773	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ 333-342, <i>pbp2b</i> a1217c <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{comX} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
PCPCCO Δ ciaHppP2 _{cib} pTEXciaH773	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ 333-342, <i>pbp2b</i> a1217c <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{cib} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i>	diese Arbeit
R6 Δ ciaHppP2 _{htrA} pTEXciaH773 Δ 1992	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{htrA} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i> , <i>spr1992::aphIII</i>	diese Arbeit
PCP Δ ciaHppP2 _{htrA} pTEXciaH773 Δ 1992	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{htrA} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i> , <i>spr1992::aphIII</i>	diese Arbeit
PCPCC _{pbp2b_PCPCCO_1}	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ 333-342, <i>pbp2b</i> a1217c	diese Arbeit
PCPCC _{pbp2b_PCPCCO_2}	<i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>ciaH</i> c773a, <i>htrA</i> Δ 333-342, <i>pbp2b</i> a1217c	diese Arbeit
R6 _{PBP2b(Q406P)_1}	<i>pbp2b</i> a1217c	diese Arbeit
R6 _{PBP2b(Q406P)_1}	<i>pbp2b</i> a1217c	diese Arbeit
R6 Δ ciaHppP2 _{htrA} pTEXciaH773 Δ spr1992	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{htrA} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i> , <i>spr1992::aphIII</i>	diese Arbeit
PCP Δ ciaHppP2 _{htrA} pTEXciaH773 Δ spr1992	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{htrA} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i> , <i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>spr1992::aphIII</i>	diese Arbeit
R6 Δ murN	<i>murN::ermAM</i>	diese Arbeit
PCP Δ murN	<i>ciaH::aad9 bgaA::tetM</i> - <i>P</i> _{htrA} - <i>lacZ</i> , <i>bgA tmp-P</i> _{tet} - <i>ciaH773-spr0568</i> , <i>pbp2x</i> ^{1-853R6,853-2258Uo5} ; <i>murE</i> ^{Uo5} , <i>pbp1a</i> ^{Uo5} , PBP2b ^{1-1350Uo5,1351-2058R6} , <i>murN::ermAM</i>	diese Arbeit

3.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide können der Tabelle 3.3 entnommen werden. Alle Plasmide sind in *E. coli* replikativ, während in *S. pneumoniae* Teilbereiche der Plasmide ins Genom integrieren.

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Selektionsbedingung	Referenz
pTP2		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
P _{cpoA} -ATG _{1,2}	pTP2 Derivat; besitzt P _{cpoA} -ATG _{1,2} -translationsfusion- <i>lacZ</i> -Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Eisel, 2008
pPP2 _{comX}	pPP2 Derivat; P _{comX} - <i>lacZ</i> -Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Kaysen, 2012
pPP2 _{cib}	pPP2 Derivat; P _{cib} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Kovács, 2009
pTEX _{ciaH202}		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Huber, 2012

In der Tabelle 3.4 sind die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Selektionsbedingung	Referenz
$P_{cpoA-ATG_1}$	pTP2 Derivat; besitzt $P_{cpoA-ATG_1-}$ translationsfusion- <i>lacZ</i> - fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
$P_{cpoA-ATG_1ATA_2}$	pTP2 Derivat; besitzt $P_{cpoA-ATG_1ATA_2-}$ translationsfusion- <i>lacZ</i> - fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracylin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pTEXciaH773		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit
pTEXciaHR6		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	diese Arbeit

3.1.3 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit für Stammkonstruktionen, Plasmidkonstruktionen und zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 3.5 bis Tabelle 3.11 aufgeführt. Die Erkennungsequenzen der Restriktionsnukleasen wurden durch Unterspreichung hervorgehoben Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in 1xTE-Puffer aufgenommen, so dass die erhaltene Stammlösung eine Konzentration von 100 pmol/μl aufwies. Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit H₂O_{dest.} auf 10 pmol/μl verdünnt. Die Lagerung der Stamm- und Gebrauchslösungen erfolgte bei – 20 °C.

Tabelle 3.5.: Oligonukleotide zur Konstruktion und Überprüfung der Plasmide zur Bestimmung des Translationsstartes von CpoA

Primer	Sequenz (5'→3')
PcpoAEco_f	CCGGAATTCTCTAGTCTCTCCTTTCTTTTGCTGATTTTATTC
PcpoABam_r1a	CGCGGATCCTTGATGCGTAATTTCTTTTCTCCATAACTACTATTATATC
PcpoABam_r1b	CGCGGATCCCCTGTCTGCTACTTTCTCACTGAACTCAAT ^T ATATTG
MCS_fwd_Kontr	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274_lac	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG

Die rot hervorgehobene AS kennzeichnet die Position der Mutation

Tabelle 3.6: Oligonukleotide zur Überprüfung der Veränderungen in PCPC, PCPCC und PCPCCO

Primer	Sequenz (5'→3')
CiaH_for	TCGGTTGTCGAAGTCTATGTTTCAAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
cia P1_2	GAATTGGTTCGTCAGGTGGC
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
htrArev2	CGAACAATTACACCAGATGTAACATTACTTGG
htrA_overBamHI_f	CGCGGATCCATGAAACATCTAAAAACATTTTACAAA
PM 91	GCAGAAAGGAGATTTTTTGCAAATTCATTG
PM 93	GCAATAGTTGCTACATACTGAGCCAAGTGC
PM 125	GCAAAAAATAGCGAGCGATTCTTCTGC

Tabelle 3.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Überprüfung von *ciaRH*

Primer	Sequenz (5'→3')
Cia_P1	GGATTAAGGCAGCCCTTGG
Cia_P3	GGTGTCTATGACTTGATTTTGCTGCTGGCTTTGATGTTGCC
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
CiaH_for	TCGGTTGTCTGAAGTCTATGTTTCAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
CiaH_up_f	TGCAGTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATACGG
CiaH_down_r	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAGC
CiaH_up_ff	CGGTATGGGAATCAAGGAAATTGCAGCACG
CiaH_down_rr	CCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATACGGTCC

Tabelle 3.8: Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von pTEX773

Primer	Sequenz (5'→3')
pTEX(MM)Xbal	TGCTCTAGAAATAAGGAGGAGTTTCTCATGATAACTTTTG CAGAGAATTTGCAAACCTTGCCTAGTGTGGGTATC
ciaH_kpn	GTCGGTACCAAATATCGCCCCAATTGGAGCG
pBP4_f	CCGATTCCGGGTTTCATATGAAAATTCCTCC
pBP5_r	ACTCCCTGACTAAGTCCAAGTAGTCGCATC
TetR(B)1	GAAGGCTGGCTCTGCACCTTG

Tabelle 3.9: Oligonukleotide zur Herstellung der *htrA*-Deletionsmutanten

Primer	Sequenz (5'→3')
htrA-ko-6	GAACAATAACCGTCCCAAATCC
SpoOJ1	GAGATATTTTACCATAGATAGC

Tabelle 3.10: Oligonukleotide zur Herstellung der *sp1992*-Deletionsmutanten

Primer	Sequenz (5'→3')
spr1992_KO5	CAGGGCAGCCCATGTTGATATCGACG
spr1992_KO6	CGATGATGTCACGCACTTGATAAGC

Tabelle 3.11: Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung der PBP2b-Konstrukte

Primer	Sequenz (5'→3')
PM98	CTGAGGACTCGTTTGGTCAGTGGACTGTGC
PM114	ACCTCTGAAACCTCGCTATCCATAAGACG
PM91	GCAGAAAGGAGATTTTTTGCAAATTCATTG
PM125	GCAAAAAATAGCGAGCGATTTCTTGC
MaM01	GTCAGGAAACCCGACCTTGACAGACC
MaM02	GGTCTGTCAAGGTCGGGTTTCCTGAC

Tabelle 3.12: Oligonukleotide zur Herstellung und Kontrolle der *murN*-Deletionsmutantne

Primer	Sequenz (5'-3')
KOmurN_1	GGCAACATGAGAAGTTTGGTGTTCACAGG
KOmurN_2_kpn	TGGGTACCGACAGATTGCATAAAGGAACGAGAAG
KOmurN_3_Eco	TGGAATTCGCAAAGCAGGTA CTTCCGTTACCATCC
KOmurN_4	GACAAATAATGATTCAACCGCACCG
ErmAM_KpnI_for	CCGCCGCGGTACCCCGCCGAGCAAAGAATGGCGG
EcoRev_2	TGGAATTCGAATTATTCCTCCCGTTAAATAATAG
KO_murN_kontrol1	GAGAGACTGACTTAGTTTGAAC TTCAG
KO_murN_kontrol2	CTGCTGGTTGCATGACAGACTTCTC

3.1.4 Nährmedien

3.1.4.1 C+Y-Medium zur Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae*

Aufgrund der komplexen Nährstoffansprüche von *S. pneumoniae* (Lacks und Hotchkiss, 1960) erfolgte die Anzucht in Flüssigkultur mittel C+Y-Medium. Die unterschiedlichen Komponenten des C+Y-Mediums wurden separat hergestellt und vor Gebrauch steril zusammen pipettiert. Die Zusammensetzung des C+Y-Mediums, sowie die der Einzelkomponenten können den Tabellen 3.12 und 3.13 entnommen werden. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung des C+Y-Mediums

Komponente	Menge
PreC	400 ml
Supplement	13 ml
Glutanmin (1 mg/ml)	10 ml
Adams	10 ml
Pyruvat (2%)	5 ml
Phosphatpuffer pH8	15 ml
Hefextrakt (5 %)	9 ml

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C+Y-Mediums

Komponente	Menge
<u>PreC</u>	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminsäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5 mittels NaOH einstellen, autoklavieren	
<u>Supplement</u>	
3 in 1 Salt	60 ml
Glukose (20 %)	120 ml
Saccharose (50 %)	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin [2 mg/ml]	120 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
<u>Adams 3</u>	
Adams 1	160 ml

3 Material und Methoden

Komponente	Menge
Adams 2	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
CaCl ₂ [0,1 M]	1,6 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
<u>Phosphatpuffer, pH 8</u>	
KH ₂ PO ₄ [1 M]	53 ml
K ₂ HPO ₄ [1 M]	947 ml
<u>3 in 1 Salts</u>	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
MnSO ₄ (0,1M) x 4 H ₂ O	0,2 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
<u>Adams 1</u>	
Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
<u>Adams 2</u>	
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

3 Material und Methoden

Komponente	Menge
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl _{konz}	10 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

3.1.4.2 D-Blutagar

Zur Kultivierung von *S. pneumoniae* auf Festmedium wurden D-Blutagarplatten verwendet. Der Agar wurde nach dem Autoklavieren auf 55 °C abkühlt und anschließend mit 3% defibrinierten Schafsblut (Oxoid) versetzt. Je nach Bedarf wurden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion hinzugeben. Der flüssige Agar wurde in sterile Petrischalen gegossen. Die Einzelkomponenten des D-Agars können der Tabelle 3.14 entnommen werden.

Tabelle 3.14: 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	15 g
H ₂ O	ad 1000 ml

3.1.4.3 LB-Medium und -Agar

Für die Anzucht von *E. coli* wurde das Komplexmedium Luria Broth (LB) verwendet. Es wurde als Fertigpulver von der Firma Roth bezogen und nach Herstellerangaben mit H₂O_{dest} versetzt und autoklaviert. Zur Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Dem Agar bzw. dem Medium wurden nach dem Autoklavieren gegeben falls Antibiotika und X-Gal in der entsprechenden Konzentration zugesetzt.

3.1.4.4 Nährmedienzusätze

Die in Tabelle 3.15 aufgeführten Antibiotika und sonstige Substanzen wurden bei Bedarf den Fest- und Flüssigmedien zugesetzt.

Tabelle 3.15: Nährmedienzusätze

Nährmittelzusatz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Cefotaxim	H ₂ O	1 mg/ml	nach Bedarf
Oxacillin	H ₂ O	1 mg/ml	nach Bedarf
Piperacillin	H ₂ O	1 mg/ml	nach Bedarf
Trimethoprim	DMSO	15 mg/ml	15 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O	200 mg/ml	200 µg/ml
Tetracyclin	70 % EtOH p.a.	3 mg/ml	3 µg/ml
Anhydrotetracyclin	70 % EtOH p.a./ H ₂ O	1 mg/ml	nach Bedarf
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O	200 mg/ml	200 µg/m
Bacitracin	H ₂ O	1 mg/ml	nach Bedarf
Erythromycin	50 % EtOH p.a.	1 mg/ml	0,5 µg/ml
X-Gal	DMF	60 mg/ml	60 µg/ml
BSA	H ₂ O	8 %	nach Bedarf
CSP	H ₂ O	10 µg/ml	100 ng/ml

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht und Stammkonservierung

3.2.1.1 Anzucht im Flüssigmedium

Die Kultivierung von *S. pneumoniae* im Flüssigmedium erfolgte unter semiaeroben Bedingungen bei 37 °C im Wasserbad. Die Anzucht von *E. coli* geschah schüttelnd bei 37 °C. Angeimpft wurde in einer Verdünnung von 1:100 entweder aus einer Glycerinkultur oder von einer D-Blutagar – bzw. LB-Agarplatte. Die Messung des Wachstums erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Ultrospec 500, Biochrom Ltd.). Als Referenz wurde unbeimpftes Medium verwendet. Alternativ wurde das Wachstum der Streptokokken durch die von Zelldichte verursachte Lichtstreuung (Nephelo N) der Kultur mittels Nephelometer (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems LTD) gemessen. Die Wachstumsrate μ und die Generationszeit g wurden über den linearen Bereich der halblogarithmischen Wachstumsphase nach folgender Formel berechnet:

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

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

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t

X_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0

$t - t_0$ = Zelldifferenz [min]

3.2.1.2 Stammkonservierung

Zur Konservierung wurden die Kulturen bis zu einer OD von ca. 0.8 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Glycerin (99,5%) mit einer Endkonzentration von 20% zugesetzt und mit der Kultur vermischt. Danach wurde die Mischung in Cryoröhrchen (Nunc) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.2 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

3.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

S. pneumoniae ist ein natürlich kompetentes Bakterium. Es erreicht seine maximale Kompetenz in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase. Deshalb wurden zur Herstellung von kompetenten Zellen die Kulturen bis zu einer OD von 0,3 in C+Y Medium inkubiert und als Glycerinkulturen abgeerntet.

3.2.2.2 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Transformation von *S. pneumoniae* wurden kompetente Zellen auf Eis auftaut. 40 µl kompetenter Zellen wurden mit 360 µl C+Y Medium (pH 7,8) verdünnt und mit 50-200 ng der zu transformierenden DNA versetzt. Zur Aufnahme der DNA wurde der Transformationsansatz 30 min bei 30 °C inkubiert. Die phänotypische Expression erfolgte anschließend bei 37 °C für 2h. Die Transformationsansätze wurden unverdünnt, sowie in den entsprechenden Verdünnungen mit Saline (0,9 % NaCl) auf D-Blutagarplatten plattiert, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten. Nach 24 – 48 h bei 37 °C wurden Einzelkolonien auf frische, selektive D-Blutagarplatten überstrichen und nochmals für 24 – 48 h bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurde Zellmaterial in Flüssigmedium überführt, bei 37 °C inkubiert und Glycerinkulturen angefertigt (3.2.1.2).

Bei Stämmen, die aufgrund genetischer Veränderungen eine verminderte Kompetenz aufweisen, wurde CSP (competence stimulating peptide) in einer Endkonzentration von 100 ng/ml dem Transformationsansatz zugeführt, um so die Kompetenz zu induzieren (Håvarstein *et al.*, 1995).

3.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Der Verlauf der Kompetenzentwicklung verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme wurde über die gesamte exponentielle Wachstumsphase bestimmt. Hierzu wurde eine Kultur 1:100 angeimpft und zu definierten Nepheloeinheiten bis zur Stationärphase Kulturproben entnommen. Diese wurden als Glycerinkulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C konserviert. Anschließend wurden diese Kulturen zur Bestimmung der Transformationseffizienz verwendet. Hierzu wurden sie mit 50 ng chromosomaler DNA des Stammes R6 Strep^R transformiert (3.2.2.2). Nach der Inkubation bei 30 °C wurde DNase 1 (Roche Applied Science) in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt,

3 Material und Methoden

um noch vorhandene freie DNA enzymatisch abzubauen. Anschließend wurden die Transformationsansätze 2h bei 37 °C inkubiert. Aus den Transformationsansätzen wurden vor dem Ausplattieren eine Verdünnungsreihe in Saline (0,9 % NaCl) hergestellt. Die niedrigen Verdünnungen wurden zur Bestimmung der Transformanten auf Streptomycin-haltigen D-Blutagar-Platten ausplattiert (Endkonzentration: 200 µg/ml), die hohen Verdünnungen wurden zur Bestimmung der Lebendkeimzahl auf antibiotikafreien D-Blutagarplatten plattiert. Die Transformationseffizienz wurde als prozentualer Anteil der Transformanten auf die Lebendkeimzahl berechnet.

3.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

3.2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli ist ein nicht natürlich kompetentes Bakterium, daher mussten die Bakterien vor der Transformation zunächst einer Behandlung unterzogen werden. Diese erfolgte in dieser Arbeit nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Dazu wurden 200 ml LB-Medium beimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Anschließend wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt und in 50 ml Greinerröhrchen aliquotiert. Die Zellkulturen wurden bei 4 °C und 8.500 rpm für 10 min abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 16 ml kalten TFB1-Puffer (Tabelle 3.16) resuspendiert und für 90 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in kaltem TFB2- Puffer (Tabelle 3.16) resuspendiert und in 100 µl Portionen in ERG aliquotiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei – 80 °C gelagert.

3.2.3.2 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (3.2.3.1) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1-10 µl der zu transformierenden DNA bzw. des Ligationsansatzes zugegeben und die Zellen nochmals 20 min auf Eis gehalten. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C unterzogen, danach direkt wieder auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (3.1.4.3) 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden anschließend unverdünnt oder mit Saline verdünnt auf LB-Agarplatten ausplattiert, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten. Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C.

Tabelle 3.16: Lösungen zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Komponente	Menge/Konzentration
TFB 1 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, bei 4°C lagern
TFB 2 Puffer	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %
	pH 8 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4 °C lagern

3.2.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken

Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode zur Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken basiert auf einem modifizierten Protokoll nach Marmur (Marmur, 1961).

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* wurden 6 ml einer Bakterienkultur bei einer Zelldichte von $N = 80$ für 10 min bei 8.500 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml eiskalter Saline (0,9% NaCl) resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Hermle Z233 M-2). Das Pellet wurde entweder zur späteren Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert oder in 180 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden anschließend 200 µl einer 2%igen SDS-Lösung und 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt, der Ansatz invertiert und bei 37 °C bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Proteinnase K-Lösung (20 mg/ml) und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 10 min. Mit Hilfe der Phenolextraktion wurden Proteinverunreinigungen von der DNA entfernt. Hierzu wurden zu dem Lysat 500 µl einer

3 Material und Methoden

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol Mischung (25:24:1) hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf dem Schüttler gerüttelt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Danach wurde bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase, die die gelöste DNA enthält, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Phenolextraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Fällung der DNA wurde zur Oberphase 500 µl kaltes Isopropanol (100%) zugesetzt, der Ansatz mehrmals invertiert und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min. Dann wurde das Pellet mit Ethanol (70%, p.a.) gewaschen und anschließend die DNA in der SpeedVac (UNIVPO 100H) (UniEquip) für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 50-100 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert. Der Tabelle 3.17 können die zur DNA-Isolierung verwendeten Lösungen entnommen werden.

Tabelle 3.17: Lösungen zur Isolierung von DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Komponente	Menge/Konzentration
NaCl	0,9 % autoklavieren
TE-Puffer	
Tris-HCL pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM autoklavieren
RNase A (Qiagen)	100 mg/ml
SDS	2 %
Proteinase K-Lösung (AppliChen)	20 mg/ml bei -20°C lagern
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	
Phenol	25 Vol.
Chloroform	24 Vol.
Isoamylalkohol	1 Vol. bei 4 °C dunkel lagern
Isopropanol p.a.	100 %
EtOH p.a.	70 %

Abk.: Vol. (Volumen)

3.2.5 Isolation der Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* wurde die „Hot Phenol Methode“ verwendet. Hierzu wurden 140 ml C+Y Medium mittels einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. 100 ml dieser Kultur wurden auf zwei 50 ml Greiner Röhrchen verteilt und bei 8000 rpm (Biofuge Startos, Heraeus Instruments) 6 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zwischen gelagert. Am Folgetag wurde das Pellet in 4 ml, auf 60 °C erwärmten, NAE-Puffer, der zuvor mit Phenol/Chloroform (6:1) gesättigt wurde, resuspendiert. Im Anschluss wurden beide resuspendierten Pellets in einem Greinerröhrchen zusammengefügt und 5 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurden 4 ml auf 60 °C erwärmter NAE-Puffer hinzugefügt, mehrmals invertiert und anschließend weitere 5 min bei 60 °C inkubiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz für 8 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Oberphase in MaXtract High Density Röhrchen (Qiagen) überführt und 4 ml NAE-Puffer, gesättigt mit Phenol/Chloroform (6:1) hinzugefügt. Der Ansatz wurde mehrfach invertiert und für 8 min bei 8.000 rpm zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Durch das in den MaXtract High Density Röhrchen enthaltene Gel, welches sich bei der Zentrifugation zwischen die organische und die wässrige Phase legt, konnte die Oberphase in ein neues MaXtract High Density Röhrchen überführt werden. Die Phenol/Chloroform Extraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Oberphase in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und durch die Zugabe von 4 ml kaltem Isopropanol und 400 µl Natriumacetat (3M, pH 5) die Gesamtnucleinsäure über Nacht bei -20 °C gefällt. Am Folgetag wurde der Ansatz für 40 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet mit 3 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und die enthaltene Nucleinsäure in 450 µl DEPC-behandelten $H_2O_{dest.}$ gelöst. Danach wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Hierzu wurde der Ansatz mit DNase I (New England Biolabs) behandelt. Der gesamte Ansatz wurde mit 10 µl (2 U/µl) DNase I (RNase-frei) und 50 µl DNase I-Puffer (10x) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Midi/Maxi Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Die RNA wurde zweimal mit je 150 µl RNase-freiem $H_2O_{dest.}$ eluiert. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt und anhand eines TBE-Agarosegels überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

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

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde in dieser Arbeit entweder das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder, zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, das NucleoBond PC 100 Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet. Der Vorteil der verwendeten Kits liegt in der rascheren Durchführbarkeit und saubereren Aufreinigung über Säulen.

3.2.7 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mittels NanoDrop®ND1000. Hierzu wurde 1 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung eingesetzt. Diese Quantifizierungsmethode beruht auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäure bei 260 nm. Da bei dieser photometrischen Konzentrationsbestimmung neben der DNA auch noch die Konzentration eventuell vorhandener Protein- oder Phenolrückstände bei 280 nm detektiert wird, kann der Quotient OD_{260}/OD_{280} als Maß für die Reinheit der DNA verwendet werden.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe nach aufzutrennen. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Geschwindigkeit mit der sich die DNA-Fragmente durch die Agarosegelmatrix bewegen, hängt neben ihrer Größe auch von ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der angelegten Spannung ab.

Die in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele hatten alle eine Konzentration von 1 bzw. 1,3 % Agarose (SeaKem LE) (Biozym). Zur Herstellung der Agarosegele wurden 100 ml 1x TAE-Puffer und 1 g bzw. 1,3 g Agarose in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung in einen mit Klebeband abgedichteten Gelschlitten gegossen, in den zur Taschenformung ein Kamm eingesetzt wurde. Nach vollständiger Auspolymerisierung der Gelmatrix wurden Klebeband und Kamm entfernt und der Schlitten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Das Gemisch aus DNA-Lösung und der entsprechenden Menge 6x DNA-Probenpuffer wurde in die Geltaschen gegeben. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde 5 µl eines Größenmarkers der Firma Fermentas (GenRuler™, 1kb Ladder) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 – 130 Volt solange durchgeführt, bis der im Probenpuffer befindliche Farbstoff das unterste Drittel des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde

3 Material und Methoden

das Gel in einem Ethidiumbromidbad (ca. 0,5 µg/ml) gefärbt. Da Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA interkaliert, kann die DNA mittels UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) auf einem Transilluminator (Oncor[®] M-20, Appligene) sichtbar gemacht werden. Mit der Video Copy Processor Kamera (P86E, Mitsubishi) wurden die Resultate der Gelelektrophorese dokumentiert.

Alternativ zum TAE-Puffer, wurde für die Auftrennung von RNA TBE-Puffer verwendet.

Die bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Lösungen können der Tabelle 3.18 entnommen werden.

Tabelle 3.18: Bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendete Lösungen

Puffer	Komponente	Konzentration/Menge
TAE-Puffer (50x)	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 0,8	100 ml
	H ₂ O <small>bidest.</small>	ad 1000 ml
	vor Gebrauch 1:50 verdünnen	
TBE-Puffer (10x)	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O dest.	Ad 1000 ml
	Vor Gebrauch 1:10 verdünnen	
Ethidiumbromid		0,5 µg/ml

3.2.8.1 DNA-Elution aus Agarosegelen

Um unerwünschte Nebenprodukte von PCR-Reaktionen und enzymatisch verdauten Plasmiden zu verhindern, erfolgte die Aufreinigung der zur Klonierung verwendeten Plasmide und PCR-Produkte aus dem Agarosegel. Entsprechend dem aufzureinigenden Volumen wurden Agarosegele mit vergrößerten Taschen gegossen. Um zu verhindern, dass die aufzureinigenden Produkte mit dem Ethidiumbromid in Berührung kommen, wurden die Gele nach beendeter Gelelektrophorese (2.6.3) so mit einem Skalpell geschnitten, dass neben dem zu präparierenden Agarosestück, zwei

flankierende Gelteilstücke entstanden. Diese wurden im Ethidiumbromdibad gefärbt, anschließend die Position der DNA-Bande unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und markiert. Mit Hilfe dieser Markierung wurden die gewünschten Produktbanden aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit dem Nucleospin[®] Extract II Kit (Marcherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

3.2.9 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird verwendet, um gezielt lineare doppelsträngige DNA-Produkte mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase zu amplifizieren (Mullis *et al.*, 1992). Das Prinzip beruht auf der Verwendung einer hitzestabilen Polymerase und zwei gegenläufigen synthetischen Oligonucleotiden, die sich an das 3-Ende der DNA-Einzelstränge binden und den zu amplifizierenden Bereich begrenzen. Eine PCR besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA zunächst auf eine Temperatur von 94-98 °C erhitzt. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen, wodurch der DNA-Doppelstrang anschließend als zwei Einzelstränge vorliegt. Das Absenken der Temperatur auf 5 °C unter den Schmelzpunkt der verwendeten Primer, ermöglicht diesen, sich an diese einzelsträngige DNA anzulagern (Annealing). Im letzten Schritt, der Elongation, füllt die DNA-Polymerase vom 3'-Ende der angelagerten Primer aus, die Lücken im DNA-Strang auf. Die Temperatur wird in diesem Schritt so gewählt, dass sie dem Wirkungsoptimum der verwendeten Polymerase entspricht. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase gewählt. Durch 30-35-fache Wiederholung der Zyklen, kommt es zu einer Akkumulation der gewünschten DNA-Fragmente.

Die Polymerasekettenreaktionen wurden in Thermocyclern (T1 Thermocycler, T-Gradientcyler, Biometra) durchgeführt. In Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Die iProof[™] Hight FidelityDNA-Polymerase (BioRad) wurde aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion (3' → 5' Exonuclease) hauptsächlich zur Herstellung von PCR-Produkten verwendet, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten.

Der Reaktionsansatz und das Standardprogramm von PCRs mit iProof[™] Hight FidelityDNA-Polymerase sind in den Tabellen 3.19 und 3.20 aufgeführt.

Tabelle 3.19: Reaktionsansatz PCR iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase

Komponente	Volumen [μl] pro Ansatz
5x Reaktionspuffer	10
MgCl ₂ (50 mM)	1
Forward Primer (10 pmol/μl)	1
Reverse Primer (10 pmol/μl)	1
Template DNA (100 ng/μl)	1
dNTPs (10 mM)	1
iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase	0,5
H ₂ O	34,5

Tabelle 3.20: Standardprogramm PCR iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1 Initiale Denaturierung	98	30
2 Denaturierung	98	10
3 Annealing	T _m -Primer – 5 °C	30
4 Elongation	72	30
5 finale Elongation	72	600
6 Pause	10	

Die Schritte 2-4 wurden 30-35 x durchlaufen

Alternativ zur PCR iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase wurde die DreamTag-Polymerase verwendet.

Reaktionsansatz und Standardprogramm der DreamTag Polymerase können den Tabellen 3.21 und 3.22 entnommen werden.

Tabelle 3.21: Reaktionsansatz DreamTagPolymerase

Komponente	Volumen [μ l] pro Ansatz
DreamTaq Master-Mix	25
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	1
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	1
Template DNA (100 ng/ μ l)	1
H ₂ O	23

Tabelle 3.22: Standardprogramm DreamTagPolymerase

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]
1 Initiale Denaturierung	96	300
2 Denaturierung	96	30
3 Annealing	T _m -Primer – 5 $^{\circ}$ C	30
4 Elongation	72	210
5 finale Elongation	72	600
6 Pause	10	

Die Schritte 2-4 wurden 30-35 x wiederholt

3.2.9.1 Kultur-PCR

Zur Überprüfung von Transformanten wurde die Methode der Kultur-PCR verwendet. So war es möglich auf die Isolierung der DNA zu verzichten. Hierzu wurden 100 μ l Kultur für 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 40 μ l H₂O resuspendiert und 2 μ l als Template pro PCR-Reaktion eingesetzt.

3.2.9.2 Überlappende PCR

Eine besondere Art, der in dieser Arbeit durchgeführten PCR stellt die sogenannte überlappende PCR dar. Mit der überlappenden PCR können DNA-Fragmente mit homologen Überhängen

3 Material und Methoden

zusammengefügt werden, sodass ein Fragment über die volle Sequenzlänge entsteht und amplifiziert wird.

Zuerst wurden in einer konventionellen PCR die Einzelfragmente mit homologen Überhängen generiert (Tabelle 3.23). In der anschließenden überlappenden PCR wurden diese dann als Template verwendet (Tabelle 3.24). Hierbei wurde zunächst ein PCR-Zyklus ohne Primer durchgeführt (Tabelle 3.24) bei der sich die homologen Enden der beiden Fragmente aneinander lagerten und selbst als Primer bzw. Template für die DNA-Polymerase fungierten. So entstanden DNA-Einzelstränge, die sich über die gesamte Länge der beiden Sequenzen erstrecken. Diese fungieren nach der Primerzugabe als Template und wurden amplifiziert. Die Methodik der Überlappenden PCR wurde in dieser Arbeit zur Herstellung der PBP2b-Konstrukte mit eingebrachter Q₄₀₆P-Punktmutation verwendet.

Tabelle 3.23: Reaktionsansatz Überlappende PCR mit PCR iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase

Komponente	Menge [μl]
Template DNA 1	0,5
Template DNA 2	0,5
5x Reaktionspuffer	10
dNTPs (10 mM)	1
iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase	0,5
H ₂ O _{dest.}	Ad 50
Nach dem ersten Zyklus zugeben:	
Forward Primer (10 pmol/μl)	2,5
Reverse Primer (10 pmol/μl)	2,5

Tabelle 3.24: Standardprogramm Überlappende PCR mit PCR iProof™ Hight FidelityDNA-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	95	300
2	60	60
3	72	30/kb
4	30	Pause (Primerzugabe)
5	98	30
6	98	10
7	T_m -Primer – 5 °C	30
8	72	30/kb
9	72	300
10	10	

Die Schritte 6-8 wurden 30-35 x wiederholt

3.2.9.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um die DNA-Polymerase, überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen, wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Hierzu wurde Jet Quick PCR-Purification Spin Kit 250 (Genomed, Löhne) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von SeqIT GmbH & Co. KG Kaiserslautern durchgeführt. Die dort durchgeführte Sequenzierungsreaktion beruht auf der Kettenabbruchreaktion von Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Bei dieser Methode wird zu der zu sequenzierenden DNA, die DNA-Polymerase, ein Nucleotidgemisch aus Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), der jeweilige Primer und fluoreszierendes 2,3-Didesoxynucleosidtriphosphat hinzugefügt. Während der DNA-Synthese werden die dNTPs in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Da ihnen am C-Atom die Hydroxylgruppe an der Ribose fehlt, kommt es an dieser Position zum Abbruch der Amplifikation. Es entstehen

3 Material und Methoden

unterschiedlich lange DNA-Fragmente mit endständiger Fluoreszenzmarkierung, die mittels der Elektrophorese aufgetrennt werden können. Die unterschiedliche Markierung der vier dNTPs ermöglicht die Detektion der DNA-Fragmente durch einen Argon-Ionen-Laser. Die Fluoreszenzsignale wurden mit der entsprechenden Computersoftware ausgewertet.

Die Daten wurden vom Sequenzierinstitut als seq-Datei (Textdatei) sowie als Chromas-File versendet. Die folgende Computersoftware wurden zur Auswertung der Sequenzierungsdaten verwendet:

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

3.2.11 Genomsequenzierung

Die Sequenzierung der Genome von PCP und PCPCCO erfolgte nach der Illumina paired-end Technologie. Das Zusammenfügen der Reads erfolgte durch den Newbler Assembler Version 2.6. Da sowohl das Genom des Rezipienten R6 (Hoskins *et al.*, 2001), wie auch das des Donorstammes Uo5 (Reichmann *et al.*, 2011) vollständig sequenziert sind, konnten die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse von PCP und PCPCCO mit diesen verglichen werden. Eine Zusammenfassung der Assemblierung kann der Tabelle 3.25 entnommen werden.

Tabelle 3.25: Zusammenfassung Assemblierung

	PCPCCO	PCP
Sequenztechnologie :	Illumina paired-end	Illumina paired-end
# of files:	2	2
Reads	2.358.666	2.330.466
Nucleotides	356.158.566	351.900.366
<i>Spn</i> R6-Coverage (2.038.617 nt)	174,7x	172,6x
Assemblierung	gsAssembler (Newbler) 2.6	gsAssembler (Newbler) 2.6
Contigs (>=100 bp)	157	171
Scaffolds:	-	28

	PCPCCO	PCP
N50 scaffolds:	-	131.156
Nucleotides in scaffolds (without N):	1.987.327 (contigs)	1.971.219
<i>Spn</i> R6-Coverage (2.038.617 nt)	0,98x	0,97x

3.2.12 Enzymreaktionen mit DNA

3.2.12.1 Restriktion von Nukleinsäuren

Restriktionsnucleasen schneiden die DNA an spezifischen Stellen und bilden dabei charakteristische Enden. Die im Zuge dieser Arbeit benutzten Restriktionsenzyme stammen von der Firma New England Biolabs (NEB). Damit die Enzyme ihre bestmögliche Aktivität entwickeln können, müssen den Restriktionsansätzen entsprechende Puffer beigesetzt werden. Die Wahl der Puffer entsprach den Herstellerempfehlungen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurde der Verdauungsansatz auf ein 1 bzw. 1,3%iges Agarosegel aufgetragen. Die Aufreinigung erfolgte entweder direkt mittels Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) oder über ein Agarosegel mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

3.2.12.2 Ligation

Zur Ligation wurde die T4 DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Diese Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphatenden und den 3'-Hydroxylenden. Vektor und Insert wurden in der Regel in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Der Ligationansatz ist in Tabelle 3.26 aufgeführt.

Tabelle 3.26: Ligationsansatz

Komponente	Menge
Insert-DNA	x μ l
Vektor-DNA	x μ l
T4 DNA-Ligase	1 μ l
T4-Ligasepuffer	2 μ l
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 μ l

x steht hierbei für eine variable Menge an Insert/Vektor-DNA

3.2.13 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von *S. pneumoniae*

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums an, bei der kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der MHK die Plattenverdünnungsmethode angewendet. Es wurden D-Blutagarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums gegossen. Hierzu wurde eine entsprechende Menge D-Agar hergestellt und zu 47,5 ml in 100 ml Schraubdeckelglasflaschen (Schott), in die zuvor 0,7 g Agar abgewogen wurden, aliquotiert. Die so hergestellten Aliquote wurden für 20 min autoklaviert und anschließend auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt. Zu dem geschmolzenen Agar wurde 3 % defibriniertes Schafsblut und die gewünschte Menge Antibiotika-Stammlösung, adjustiert auf 1 ml mit sterilem H₂O, hinzugefügt. Diese Mischung wurde auf 12x12 cm große Petrischalen gegossen, die zuvor in neun 4x4 cm große Quadrate unterteilt wurden.

Die zu testenden Stämme wurden in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 30, was ungefähr $1,5 \cdot 10^8$ cuf/ml entspricht, in Wasserbad bei 37 °C herangezogen, mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung 1:1000 verdünnt und jeweils 30 μ l dieser Verdünnung auf das entsprechende Quadrat getropft. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C für 48 h.

3.2.14 Analyse von Expressionssignalen in *S. pneumoniae*

Zur Analyse von Expressionssignalen wurden die Plasmide pPP2 und pTP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) verwendet. Diese ermöglichten es durch β -Galaktosidaseassays, die Expressionssignale, indirekt über die Messung der gebildeten β -Galaktosidase in der Zelle zu bestimmen.

Beide Plasmide replizieren in *E. coli* und vermitteln durch das β -Laktamase Gen *bla* Resistenz gegen Ampicillin, worüber auch die Selektion erfolgt. Neben Genen, die der Replikation und Ampicillinresistenz dienen, sowie dem Reporter gen, befinden sich auf dem Plasmid auch Gene zur Integration ins *S. pneumoniae* Genom. Zur Integration dienen die beiden unvollständigen Gene *'spr0564* und *'bgaA* aus *S. pneumoniae*. Im Zuge der homologen Rekombination wird das native β -Galaktosidasegen *bgaA* durch eine defekte Kopie ausgetauscht. Somit hängt die Menge an gebildeter β -Galaktosidase ausschließlich von der Stärke des vor *lacZ* klonierten Fragmentes ab. Zur Selektion in *S. pneumoniae* enthalten die Plasmide das Resistenzgen *tetM*, welches Tetracyclinresistenz vermittelt.

Bei pPP2 wird der zu untersuchende Promotor vor das promotorlose *lacZ* Gen kloniert. Die Signale zur Initiation der Translation des *lacZ* Gens stammen von dem Gen *htrA* aus *S. pneumoniae*, um die effiziente Translation von *lacZ* in *S. pneumoniae* zu ermöglichen.

Im Gegensatz zu pPP2 fehlt dem *lacZ* Gen in pTP2 neben einem eigenen Promotor die Signale zur Initiation der Translation und die Codons für die ersten acht Aminosäuren der β -Galaktosidase. Dementsprechend muss ein Promotor, Signale zur Initiation der Translation und ein Startcodon vor *lacZ* kloniert werden.

3 Material und Methoden

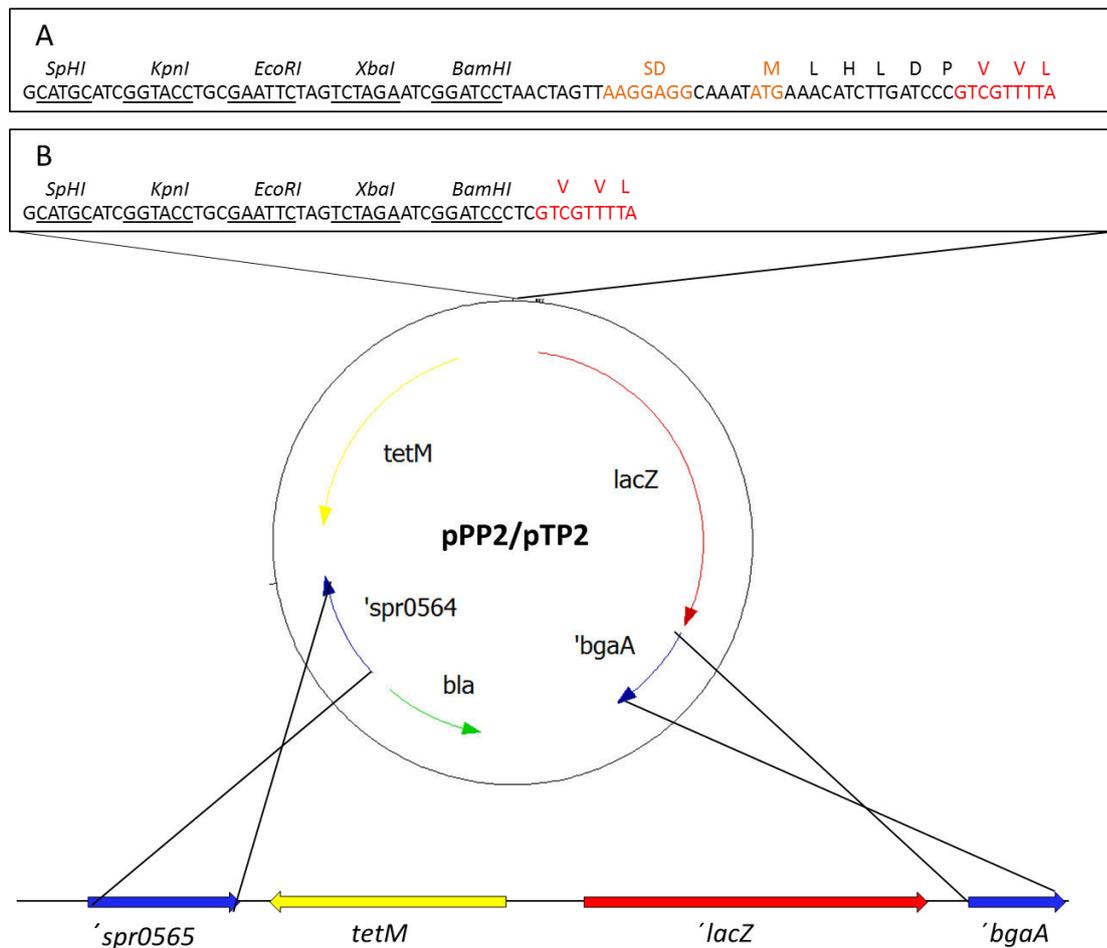


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der genetischen Organisation von pPP2 und pTP2, sowie deren Integration ins Genom

Die Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet: *bla*: β -Lactamase (Ampicillinresistenz), *tetM*: Tetracyclinresistenz, *'lacZ*: β -Galaktosidase, *'bgaA*: endogene β -Galaktosidase. Im Sequenzausschnitt A (pPP2) ist die Multiple Cloning Site und der Beginn des promotorlosen β -Galaktosidase Gens *'lacZ* gezeigt. Die Ribosomenbindestelle (SD) und das *'lacZ* Startcodon sind orange unterlegt. Die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme in der MCS sind unterstrichen. Die Aminosäuren 9-11 von *E. coli lacZ* sind rot hervorgehoben. Im Sequenzausschnitt B (pTP2) ist die Multiple Cloning Site und der Beginn des promotorlosen β -Galaktosidase Gens *'lacZ* gezeigt. Neben dem Promotor fehlen auch die Ribosomenbindestelle (SD) sowie das *'lacZ* Startcodon. Die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme in der MCS sind unterstrichen

3.2.15 Nachweis der β -Galactosidaseaktivität

Das in dieser Arbeit durchgeführte β -Galactosidaseassay beruht auf dem Prinzip von Miller (Miller, 1972). Hierbei wird die Menge an β -Galactosidase indirekt über die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP) ermittelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym β -Galactosidase. Die Menge an o-Nitrophenol wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt und stellt ein Maß für

3 Material und Methoden

die, sich im Reaktionsansatz befindliche β -Galactosidasemenge dar. Die Zunahme der Extinktion wurde photometrisch über einen Zeitraum von 15 min verfolgt.

3.2.15.1 Durchführung des β -Galaktosidaseassays

Zur Durchführung eines β -Galaktosidaseassays wurde eine Zellkultur bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im Wasserbad inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden 3 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ l Lysepuffer (Tabelle 3.27). resuspendiert. Der Ansatz wurde bis zur Lyse bei 37 °C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Zum Starten des β -Galaktosidaseassays wurden 200 μ l Lysat mit 800 μ l vorgewärmten ONPG versetzt. Die Messung erfolgte im Photometer (UV-10 UV-Vis, Thermo Scientific) über einen Zeitraum von 15 min mit Messintervallen von 40 s.

Tabelle 3.27 Zur Durchführung des β -Galaktosidaseassays verwendete Lösungen

Komponente	Konzentration
Z-Puffer (pH 7)	
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	46 mM
MgSO ₄	1 mM
β -Mercaptoethanol	2,7 ml/l
Lysepuffer	
Z-Puffer	
TritonX100 (Stammlösung 10 %)	0,05 %
ONPG	
ONPG	1 m/ml in Z-Puffer

3.2.15.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Hierzu wurde Roti[®]-Quant (Roth) verwendet. Dieses enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue-G250. Durch die Komplexbildung mit Proteinen, geht der Farbstoff von einer kationischen in einen anionischen Zustand über. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von zuvor 470 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann als Maß für die Proteinkonzentration herangezogen werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 10 µl Lysat mit 90 µl Z-Puffer versetzt (Tabelle 3.27). Zu diesem Ansatz wurden 700 µl Z-Puffer und 200 µl Roti[®]-Quant (Roth) zugefügt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurden 10 µl Lysepuffer verwendet.

Als Standard wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt.

3.2.15.3 Auswertung des β-Galactosidaseassays

Die β-Galaktosidaseaktivität wird als Units in nmol freigesetzten o-Nitrophenol (ONP) pro mg Protein pro Minute angegeben, das sich folgendermaßen berechnet:

$$Units = \frac{s * V}{\epsilon * d * m} * \left(\frac{nmol}{min * mg} \right)$$

s= Steigung des Absorptions-Zeit-Graphen= $\Delta OD_{420} / \Delta t [1/min]$

V= Reaktionsvolumen

ϵ = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei 420 nm= $4,5 * 10^3 [l/mol * cm]$

d= Lichtweg= Dicke der Küvette= 1 cm

m= Masse des Proteins im Ansatz[mg]

3.2.16 Herstellung von Zelllysaten und Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen

Zur Darstellung von Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs) verschiedener *S. pneumoniae* Mutanten wurden diese mit Bocillin (Molecular Probes) markiert (Zhao *et al.*, 1999). Bocillin ist ein fluoreszierendes Penicillin V-Derivat, das an PBPs bindet. Durch Verwendung des Fluorimager 595 (FluorImagerTM 595, Molecular Dynamics) können die PBPs anschließend sichtbar gemacht werden. Zur Lysatherstellung wurden die Stämme in 6 ml C-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend bei 8.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos Zentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 20 mM Natriumphosphatpuffer (Tabelle 3.28) resuspendiert, der zuvor mit 0,2 % Triton X-100 versetzt wurde. Die Menge an Natriumphosphatpuffer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge an Natriumphosphatpuffer [ml]} = \text{Kulturvolumen [ml]} \times \frac{\text{OD Wert} \times 100}{20} \times 5\mu\text{l}$$

Nachdem die Pellet vollständig in der entsprechenden Menge an Natriumphosphatpuffer resuspendiert wurden, wurden sie für 30 min bei 37 °C in Wasserbad lysiert. Anschließend wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Bocillinmarkierung erfolgte durch Zugabe von 3 µl 10 µM Bocillin zu 5 µl Lysat. Die Proben wurden für 10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und vor dem Gelauftrag mit 2-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C erhitzt.

Tabelle 3.28: Zusammensetzung Natriumphosphatpuffer

Komponente	Volumen
NaH ₂ PO ₄ (1M)	42,3 ml
Na ₂ HPO ₄ (1M)	57,7 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
	pH 7,2 mit HCl einstellen, autoklavieren, vor Gebrauch auf 20 mM verdünnen

3.2.17 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page (Laemmli, 1970) ermöglicht es Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. SDS bindet an die hydrophoben Bereiche eines Proteins. Durch diese irreversible Bindung wird die Sekundärstruktur eines Proteins zerstört. Der SDS-Protein-Komplex ist stark negativ geladen und überdeckt die Eigenladung des Proteins. Im elektrischen Feld wandert er zum Plus-Pol und ermöglicht so die Austrennung entsprechend des Molekulargewichtes. Als Molekulargewichtsstandard wurde der peqGold Proteinmarker II (peqlab) verwendet, bei Gele die anschließend zur Immunodetektion verwendet wurden, wurde der peqGold Proteinmarker IV (peqlab) aufgetragen. Die zur SDS-Page verwendeten Gele setzen sich aus einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel zusammen. Im Sammelgel werden die Proben konzentriert, bevor sie im Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Die Gelmatrix besteht hierbei aus monomerem Acrylamid, welches durch Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) zu langen, durch Methylenbisacrylamid Ketten polymerisiert. Der Vernetzungsgrad der Matrix und somit die Größe der Poren wird durch den Bisacrylamidanteil bestimmt.

Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels kann den Tabellen 3.29 und 3.30 entnommen werden.

Tabelle 3.29: Zusammensetzung eines kleinen Sammelgels

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

Bei großen Gelen wurde das dreifache Volumen verwendet.

Tabelle 3.30: Zusammensetzung eines kleinen Trenngeles

% Gele	7,5	10
H ₂ O (ml)	2,43	6
Rotiphorese ®Gel 30*	1,25	4,95
1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	1,25	3,75
10 % SDS (µl)	50	150
10 % APS (µl)	25	75
TEMED (µl)	2,5	7,5

*= 37,5 % AA (=Acrylamid)/ 1 % BAA (=Methylenbisacrylamid), C. Roth GmbH & Co, APS= Ammoniumpersulfat, TEMED= Tetramethylethyldiamid, Bei großen Gelen wurde das dreifache Volumen verwendet.

3.2.17.1 Herstellung von SDS-Gelen

Zur Herstellung von kleinen SDS-Gelen wurden zwei Glasplatten zunächst mit Ethanol und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurden sie in eine Minigel-Apparatur (Biorad) gespannt. Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels (Tabelle 3.28) zusammen pipetiert und zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet, sodass eine glatte Oberfläche entsteht. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser mittels Whatman-Papiers entfernt und das Sammelgel eingegossen. Zum Schluss wurde noch ein Kamm in das Sammelgel zur Bildung der Probenaschen gesteckt. Zur Herstellung von großen SDS-Gelen wurden die Glasplatten mit Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt, mit zwei Spacern und vier Klammern zusammengesetzt. Die fixierten Glasplatten wurden in seinen Sockel gestellt, der zuvor mit 1,5 % iger Agaroselösung gefüllt worden war. Durch das Aushärten der Agarose wurden die Gele nach unten hin abgedichtet. Nun wurden die Komponenten des Trenngeles (dreifache Menge eines kleinen Trenngeles Tabelle 3.30) zusammengefügt und eingegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das Wasser entfernt, die Komponenten des Sammelgels (Menge zwei kleiner Sammelgele, Tabelle 3.29) zusammengefügt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Auspolymerisierung wurden die Gele aus dem Agarosesockel entfernt, in feuchte Tücher eingewickelt und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Gele in eine Gelelektrophoreseapparatur gesetzt. Die Kammer wurde mit 1x Laemmli-Laufpuffer gefüllt und anschließend die Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand bei 35 mA statt.

3.2.17.2 Färbung der SDS-Gele

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Gelelektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Dieses besteht aus einem saurem Farbstoff, der einen Komplex mit den basischen Seitenketten von Proteinen eingeht und so sichtbar macht. Zur Färbung wurde das Gel zunächst 1-2 h in der Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel 2 h im Entfärber 1 und mehrere Stunden im Entfärber 2 entfärbt.

Die Zusammensetzung der Färbelösung, sowie der Entfärber können der Tabelle 3.31 entnommen werden.

Tabelle 3.31: Verwendete Puffer zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Puffer	Komponente	Volumen
5x-Laemmli-Laufpuffer	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 2000 ml
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 Nach im geschlossen Gefäß rühren	
Entfärber 1	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
Entfärber 2	Methanol	100 ml
	Essigsäure	50 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

3.2.18 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Beim Western-Blot werden die zuvor über eine SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Zu Beginn des Westernblots wurde eine PVDF-Membran (Rothi®-PVDF, C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe) auf die Größe eines Gels zugeschnitten. Zum Aktivieren der Membran, wurde diese in 100 % Methanol geschwenkt und anschließend mit Wasser abgespült. Pro Westernblot wurden 4 Whatman-Papiere auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer geschwenkt. Alle weiteren Komponenten des Westernblots wurden ebenfalls in Blotpuffer benetzt. Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurde der Blot wie folgt zusammen gebaut. Das Trenngel und die Membran wurden luftblasenfrei zwischen je zwei Whatman-Papiere und einen Schwamm gelegt. Anschließend wurde alles in einem Gitter fixiert und in eine Blotapparat (Bio-Rad) gesteckt. Zur Kühlung wurde die dafür vorgesehene Kammer mit Eis befüllt. Die Membran wurde zur Anode hin ausgerichtet, während sich das Gel in Richtung der Kathode befindet. So können die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe vom Gel auf die Membran transferiert werden. Die Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt. Das Blotting erfolgte für 1 h bei 100 V. Anschließend wurde die Membran aus der Blotapparat entfernt und für 30 min in 15 ml PBST geschwenkt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Daraufhin wurde die Membran nochmal weitere 5 min mit frischem PBST gewaschen, bevor die Membran mit dem ersten Antikörper überschichtet wurde. Die Inkubation des ersten Antikörpers fand bei Raumtemperatur für 1 h oder über Nacht bei 4 °C statt. Der primäre Antikörper wurde in 10 ml PBST verdünnt, der Verdünnungsfaktor wurde für jeden Antikörper spezifisch gewählt. Anschließend wurde die Membran wiederholtes gewaschen (2 min PBS, 2x 5 min PBST, 2 min PBS) um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Dann erfolgte die Überschichtung der Membran mit dem zweiten Antikörper. Bei diesem handelt es sich entweder um anti-rabbit (1:30000 in PBST, Sigma) oder anti-mouse (1:1000 in PBST, Sigma). Die sekundären Antikörper binden spezifisch an die primären Antikörper und sind mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgte schwenkend für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen (2 min PBS, 2x 5 min PBST, 2 min PBS). So konnten überschüssiger Antikörper entfernt werden. Zum Färben der Membran wurde diese mit frisch zusammenpipetierter Blotfärbelösung überschichtet. Die Färbelösung enthält BCIP (5-Bromo-4 Chloro-3-indolyl-Phosphat) und NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid). Die an den sekundären Antikörper gebundene alkalische Phosphatase reagiert enzymatisch mit NBT/BCIP, ein blaues Substrat entsteht. Die Färbelösung fand für 3-20 min bei Raumtemperatur oder bei 37°C statt.

Die beim Westernblot verwendeten Lösungen können der Tabelle 3.32 entnommen werden.

Tabelle 3.32: Lösungen für Westernblot

Blotpuffer	Komponente	Volumen
Blotpuffer	Glycerin	7,2 g
	Tris	1,5 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
20 x PBS	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml
PBST	20 x PBS	100 ml
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 2000 ml
Blotsubstratpuffer	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml
		pH auf 9,5 einstellen, autoklavieren
Blotfärbelösung	Blotsubstratpuffer	9 ml
	Stocklösung NBT/BCIP (Roche)	60 µl

3.2.19 Trennung der Membran- und cytoplasmatischen Fraktion mittels Ultrazentrifugation

S. pneumoniae Zellen wurden im C+Y-Medium bis zu einer Zelldichte von $N=80$ bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckmann J2-21). Anschließend wurden die Pellets in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und mit 500 mg Glasperlen pro 100 mg Nassgewicht versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte für 20 min in der Zelmühle (Vitrogen-Zelmühle Typ VI-4, Edmund Bühler GmbH). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation entfernt (6 min, 14.000 rpm, 4 °C, Hermle Z513K). Die Trennung der Membranfraktion zur cytoplasmatischen Fraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation (Beckman, TLA 100.4 rotor) für 120 min, bei 60.000 rpm und 4 °C. Die Pellets wurden in der Hälfte des Volumens des Überstandes resuspendiert. Die Fraktionen wurden bei –80 °C gelagert. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 3 µl pro Fraktion verwendet. Die Westernblotanalysen zum Nachweis von CpoA innerhalb der Membranfraktion wurden wie in 3.2.18 beschrieben durchgeführt.

3.2.20 Microarray-gestützte Transkriptionsanalyse

Mittels der Microarray gestützten Transkriptionsanalyse ist es möglich Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Mutanten aufzuzeigen.

3.2.20.1 Das *Streptococcus pneumoniae* R6/TIGR –Oligonukleotid Set

Das in dieser Arbeit verwendete Oligonucleotidset wurde in Kooperation mit der Firma Eurofins MWG Operon entwickelt. Es besteht aus insgesamt 2963 Oligonukleotide, davon 2038 Oligos spezifisch für *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4, 328 Oligos für intergene Bereiche in *S. pneumoniae* R6, sowie 309 Oligos für *S. pneumoniae* TIGR spezifische Gene und 160 intergene Regionen. Weiterhin befinden sich auf diesem Oligonucleotidset 44 Oligos für repetitive Elemente, ribosomale RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), sowie das *pbp2x* aus *S.pneumoniae* 2349. Des Weiteren sind verschiedene Kontrollen, darunter Positiv-, Negativ-, sowie Pufferkontrollen im Set enthalten. Bei den Oligonukleotiden handelt es sich um 70meren die einen 5'-AminoC6-Linker enthalten, mittels diesen sie eine kovalente Bindung mit den Epoxy beschichteten Slides (Nexterion HiSense Slides E, Schott) eingehen können.

3 Material und Methoden

Die Oligos sind in jeweils 30 µl Spottingpuffer (3 x SSC, 1,5 M Betain) gelöst, so dass sie in einer Endkonzentration von 10 µM vorliegen. Die Platten wurden bei -20°C, versiegelt in Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt. Die Oligos wurden in einer Endkonzentration von 10 µM in Spotting-Puffer (Tabelle 3.33) gelöst. Die versiegelten Platten (SealPlate, EXCEL Scientific) wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.33: Zusammensetzung des Spotting-Puffers

Komponente	Konzentration
SSC (3x)	
NaCl	0,45 M
Natriumcitrat	45 mM
	pH 7,0 einstellen
Betain	1,5 M

3.2.20.2 Spotten

Für das Spotten der Slides wurde SpotArray™ Microarray Spotting System BioChip Technologis (Packard BioScience) verwendet. Die Herstellung der Slides erfolgte nach dem sogenannten Kontaktverfahren, bei dem die Oligos mittels Mikrospottingpins aus den Mikrotiterplatten aufgenommen wurden und anschließend auf die Oberfläche der Slides aufgetragen wurden. Aus Sicherheitsgründen wurde jedes Oligo zweimal nebeneinander gespottet. Für die spätere Auswertung wurde vor dem Spotten ein gal-file erstellt, auf dem die genaue Position der Oligos auf dem Slides aufgeführt ist. Um die Slides später identifizieren zu können, wurden sie vor dem Spotten mit einem Diamantschreiber gekennzeichnet. Zusätzlich zu den Spotting-Slides wurden vier Blockingslides in die Spottingkammer gelegt. Hierbei handelt es sich um gewöhnliche Objektträger, die zuvor mit Ethanol gereinigt wurden und das Abtropfen der Pins ermöglichen. Das Spotten fand bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70 % statt. Die Mikrotiterplatten mit den sich darin befindlichen Oligonukleotiden wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 1 min bei 800 rpm zentrifugiert (Hermle Z 513 K). Die zum Spotten verwendeten Parameter können der Tabelle 3.34 entnommen werden. Die Einstellung der Parameter erfolgte mit der Software

3 Material und Methoden

SpotArray™(PekinElmer). Zur Immobilisierung wurden die Slides nach dem Spotten 30 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 60 min bei 85 °C gebacken. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Slides dunkel und trocken bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 3.34:Spotting Protokoll der ScanArray™ Software

Parameter	R6/TIGR Oligonukleotidset
Number of plates per plate change	3
Read barcodes on plates	No
Read barcodes on substrates	no
Number of pre-pints after each sample load	10
Pre-pints spot spacing, center to center [µm]	500
Number of times to print each spot within array	2
Nominal spot diameter [µm]	150
Spot spacing, center to center [µm]	345
Loaction on array on substrate	center
Leave space for a barcode/label on battom	yes
Printing approach velocity [mm/s]	10
Printing departure velocity [mm/s]	10
Printing overtravel [µm]	0
Printing dwell time [ms]	400
Sample load overtravel [µm]	100
Sample load dwell time [ms]	2500
Substrate thickness [mm]	1,1
Maximum number of spots per sample load	120

3.2.20.3 Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Proben

Um die Transkriptome zweier unterschiedlicher *S. pneumoniae* Stämme vergleichen zu können, müssen die Gesamt-RNA der beiden Stämme mittels zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe markiert und auf einem Array parallel hybridisiert werden. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden drei unterschiedliche Wiederholungen durchgeführt. Zum einem wurde jedes Oligo auf dem DNA-Chip zweimal nebeneinander gespottet. Um die unterschiedlichen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe zu berücksichtigen (Fluoreszenzintensität etc.) wurde ein Dye-Swap durchgeführt, bei dem die cDNA aus derselben Präparation verwendet, allerdings der Farbstoff ausgetauscht wurde. Des Weiteren wurden biologische Replikate verwendet, bei denen die cDNA unterschiedlicher Präparationen verwendet wurde.

Zur Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA wurde das LabelStarTM-Array-Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Desoxycytidintriphosphaten (Cy3 und Cy5-dCTP) erfolgte im Zuge dieser reversen Transkription. Zunächst wurden die RNA-Lösungen der zu vergleichenden Proben mittels der SpeedVac (UNIVAPO 100 H, UniEquip) auf eine Konzentration von 3 µg/ml eingestellt und das entstehende Pellet anschließend in 18 µl RNase freiem Wasser gelöst. Hierzu wurde 2 µl Denaturierungs-Lösung (Denaturation Solution Plus) und 1 µl Random-Oktamer-Primer (100 µM, MWG) gegeben, für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde ein Mastermix erstellt, der den dNTP-Mix, RNase Inhibitor, Reverse Transkriptase, Puffer, sowie RNase freies Wasser enthält hergestellt und 29 µl dieses Mastermixes zu den Proben gegeben. Vor der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde den Proben der jeweilige Farbstoff (Cy5 oder Cy3) beigefügt. Am Folgetag wurden die Proben entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt, zweimal mittels 15 µl Elutionspuffer eluiert, in der SpeedVac (UNIVAPO 100 H, UniEquip) eingedampft und die Pellet dunkel bei -20 °C gelagert.

3.2.20.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben

Die Hybridisierung fand in der Hybridisierstation HS 400 Pro (Tecan) statt. Das Hybridisierungsprotokoll kann der Tabelle 3.35 entnommen werden.

Zu den cDNA markierten Pellets wurden 55 µl Hybridisierungspuffer, der zuvor auf 95 °C erhitzt wurde, zugegeben und 5 min bei 95 °C im Thermoblock (HLC) inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und jeweils eine Cy3 markierte Probe des einen Stammes mit der Cy5 markierten Probe des anderen Stammes vermischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dieser

3 Material und Methoden

Inkubation wurden die Proben nochmals abzentrifugiert und zur entsprechenden Zeit in die Hybridisierstation injiziert.

Tabelle 3.35: Hybridisierungsprotokoll

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

Die zur Hybridisierung verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.36 aufgeführt.

Tabelle 3.36: Lösungen zur Hybridisierung

Komponente	Konzentration
SSC (20x)	
NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
	pH 7 mit NaOH einstellen, autoklavieren
Prähybridisierungspuffer	
SSC	4x
SDS	0,01 %
BSA (sterilfiltriert)	0,1 mg/ml
SDS	0,1 %
SSC/SDS	
SSC	2x
SDS	0,1 %
SSC	1x
SSC	0,1 x
Hybridisierungspuffer	
Nexterion®Hyp(Peqlap)	1 Vol
Formamid	1 Vol
	Lagerung -20 °C

3.2.20.5 Scannen der hybridisierten Slides

Das Einscannen der hybridisierten Slides erfolgte mit dem Laserscanner (ScanArray® GX Microarray PerkinElmer Life Sciences, USA). Hierbei wird der hybridisierte Chip nacheinander von zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge gescannt. Der Farbstoff Cy3 wurde mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 543$ nm angeregt und die Emission bei 570 nm gemessen. Der zweite Farbstoff Cy5 wurde mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 633$ nm angeregt und die Emission bei 670 nm gemessen. Vor dem eigentlichen Scansvorgang wurde zunächst ein Vorscan bei niedrigerer Auflösung (50 μm) erstellt. Dieser dient der Einstellung der Photomultiplier Tube (PMT)-Stärke. So wird gewährleistet, dass beide Fluoreszenzkanäle nahezu die gleiche Signalintensität liefern. Der Hauptscan erfolgte mit einer höheren Auflösung von 10 μm . Hierbei wurde für jeden Kanal eine Bilddatei (*tif-Datei) erstellt.

3.2.20.6 Auswertung der Microarray-Daten

Zur Auswertung der Microarray-Daten wurde die Software ScanArray® Express (Version 3.0, 2004. PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA), Microsoft Excel, sowie mehrere Anwendungen, auf der Homepage des Nana+Bio Centers der TU Kaiserslautern verwendet. Zu Beginn der Auswertung wurden die beiden tif-Dateien der beiden Kanäle übereinander gelegt und ein „Composite“-Bild erzeugt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Cy3 und Cy5 Intensitäten durch die „Adaptive circle“ Option der Software. Als Normalisierungsmethode wurde „Locally Weighted Scatter Plot Smoothing (LOWESS) (Yang *et al.*, 2001) verwendet und die Zuordnung fand über die „Auto find Spots“ Option statt. Hierbei wurde der während des Spottens erstellte *gal-File, auf dem die Position der Oligos auf dem Chip gespeichert sind, auf einander abgestimmt. Die Zuordnung der Spots erfolgt über die Software, bei Bedarf wurden einzelne Spots manuell nachjustiert. Die daraus resultierende Ergebnistabelle wurde als *csv-Datei gespeichert und in Microsoft Excel weiter bearbeitet. Zunächst wurden alle Oligos, die entweder nicht gefunden werden konnten oder von schlechter Qualität waren gelöscht. Anschließend wurden die Kontroll-Oligos überprüft und ebenfalls entfernt. Die weitere Auswertung erfolgte mittels dieser Programme, die auf der Homepage des Nana+Bio Center der TU Kaiserslautern zur Verfügung stehen. Mit Hilfe der Normalisierungsmethode „Global Loess“ wurde durch die Anwendung „Global normalization of microarray data with loess“ die normalisierten Verhältnisse der beiden Fluoreszenzkanäle berechnet (Normalized ratio). Anschließend wurden die Intensitätswerte und die Ratio, also die Verhältnisse der Intensitätsdaten der normalisierten Werte in eine Excel-Tabelle überführt. Durch den Gebrauch der Anwendung „T-test on logarithms of intensity ratios of microarray data“ wurden die Werte auf ihre Signifikanz hin untersucht. Die Mittelwerte der normalisierten Verhältnisse (Average, AVG), der P-Wert (P-Value) und der angepasste P-Wert

3 Material und Methoden

(adjusted P-value) wurden für jedes Oligo berechnet. Als signifikant wurden Gene bezeichnet deren Ratio kleiner oder gleich 0,33 beziehungsweise größer oder gleich 3 war und einen P-Wert von unter 0,03 aufwiesen.

3.2.21 Isolierung und Auftrennung von Glycolipiden

Zur Isolierung der Glycolipide von *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen wurden 200 µl einer bewachsenen Kultur in JA-Röhrchen überführt und bei 10.000 rpm für 30 min abzentrifugiert (Beckmann). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Gewicht des Pellets bestimmt. Das Pellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde das Zellpellet in 0,8 ml H₂O und 3 ml Chloroform:Methanol (1:2) pro Gramm Nassgewicht aufgenommen und in ein Corex-Röhrchen überführt. Dieses Glasröhrchen wurde verschlossen und für 2 h bei 4 °C rollend inkubiert. Danach wurde ein Teil Chloroform und ein Teil H₂O hinzugefügt, das Röhrchen mehrfach invertiert und bei 4000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die organische Phase wurde entnommen, in ein frisches Corex-Röhrchen überführt und mit einem Teil H₂O, das zuvor mit Chloroform:Methanol (1:2) equilibriert worden war, versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren, wurde dieser Ansatz wiederum bei 4000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die organische Phase wurde entnommen und zu Portionen von 100 µl in Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Diese wurden entweder in der SpeedVac (UNIVAPO 100H) getrocknet oder alternativ über Nacht unter dem Abzug bei Raumtemperatur eindampfen gelassen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Auftrennung und Darstellung der Glycolipide erfolgte über Dünnschichtchromatographie. Hierzu wurden die Glycolipidproben in 50 bis 100 µl Chloroform/Methanol (80:15) aufgenommen und auf eine Kieselgelplatte (0,025 mm, Kieselgel 60, Merck) aufgetragen. Nach vollständigen Trocknen der Proben wurden die Platten in eine Chromatographiekammer überführt, die zuvor mehrere Stunden mit dem Laufmittel (Chloroform/Methanol/Essigsäure (80:15:8)) gesättigt worden war. Die Laufzeit betrug 1,5 – 2 h. Anschließend wurden die DC-Platten aus der Laufkammer entfernt und 10 min unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet. Die Darstellung der Glycolipide erfolgte, indem die Platten mit 1-Naphthol (3,2 % w/v in Methanol/H₂SO₄/H₂O (25:3:2)) eingesprüht wurden. Die anschließende Entwicklung fand bei 110 °C im Backofen statt. Als Standards wurden GalGalDAG (Sigma) und GlcDAG verwendet.

3.2.22 Isolierung und Auftrennung von Phospholipiden

Die Isolierung der Phospholipide erfolgte entsprechend der in 3.2.19 angegebenen Methode. Die Auftrennung der Phospholipide erfolgte über zwei-dimensionale Dünnschichtchromatographie. Als Laufmittel der ersten Dimension wurde $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 65:25:4$ verwendet, als Laufmittel der zweiten Dimension $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 80:14:10:3$ (Fischer, 2000). Die anschließende Darstellung der Phospholipide erfolgte mit Molybdenum Blue spray (1,3% molybdenum oxide in 4.2 M sulfuric acid, Sigma-Aldrich).

3.2.23 Integration eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems

Im Zuge dieser Arbeit stellte sich heraus, dass das *ciaH773*-Allel zu einer starken Hyperaktivität des CiaRH-Systems führt. Es kam vermehrt zu Zusatzmutationen, die die Aktivität des Zweikomponentensystems minderten. Um dies zu vermeiden, sollten Stämme konstruiert werden, welche das hyperaktive *ciaH773*-Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors besitzen. Dies ermöglicht es die Stämme während der Konstruktion in einem uninduzierten Zustand, vergleichbar mit ΔciaH , zu halten und die Induktion des *ciaH773*-Allels erst bei der jeweiligen Messung zu starten. Als Grundlage der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide pTEX*ciaH773* und pTEX*ciaHR6* diente das Plasmid pTEX2.

Das Tetracyclin-Repressor TetR basierte Expressionssystem stammt aus *Staphylococcus aureus* (Helle *et al.*, 2011). Das *tetR* Gen und der Tetracyclin-induzierbare Promotor $P_{\text{xyl}/\text{tet}}$ stammen aus dem Plasmid pRAB11 und wurden in das integrative Plasmid pSW1 transferiert umso pTEX2 zu bilden.

Über die Gene *spr0566* und *bgsA* kann pTEX*ciaH773* bzw. pTEX*ciaHR6* durch homologe Rekombination in das *S. pneumoniae* Genom integrieren. Die Selektion in *S. pneumoniae* erfolgt mittels Trimethoprim. Die Selektion der Transformanten in *E. coli* wird über das Ampicillinresistenzgen (*bla*) ermöglicht.

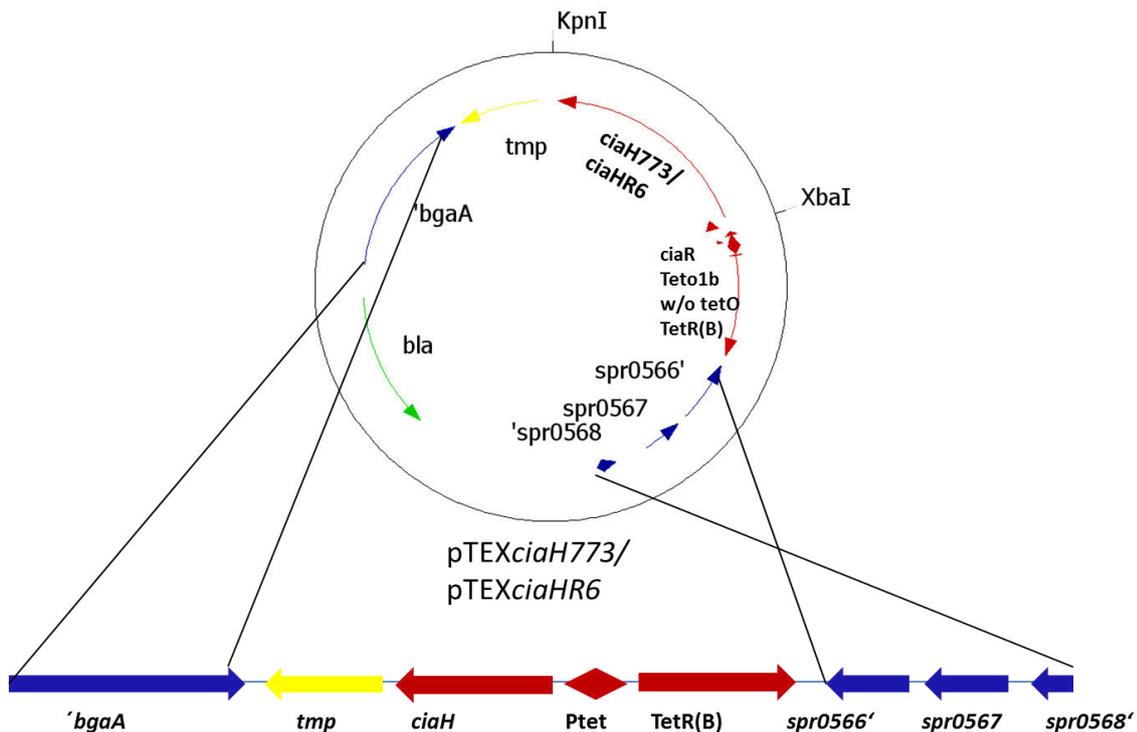


Abbildung 3.2: Genetische Organisation des induzierbaren Integrationsplasmids pTEXciaH773/pTEXciaHR6 und dessen Integration in das *S. pneumoniae* Genom

Gezeigt ist die genetische Organisation des induzierbaren Integrationsplasmids pTEXciaH773/pTEXciaHR6 und dessen Integration in das *S. pneumoniae* Genom. Oben: Genkarte des pTEXciaH773-Plasmids bzw. pTEXciaHR6-Plasmids. Unten: Genetische Region zwischen *bgaA* und *spr0568* nach der Integration von pTEXciaH773 bzw. pTEXciaHR6. Die Pfeile kennzeichnen die einzelnen Gene auf dem Plasmid und im Genom: *bla*: β -Laktamase (Ampicillin Resistenz), *'bgaA*: Teil des β -Galaktosidase Gens, *tmp*: Trimethoprim Resistenz, *spr0566-spr0568*: Funktion unbekannt, *lacZ*: β -Galaktosidase Gens. Da *ciaR* und *ciaH* sich zusammen in einem Operon befinden, wurden die *ciaH*-Allele zusammen mit einem sogenannten *ciaR*-Minigen kloniert. Somit bleibt die Translationseinheit erhalten. Da große Teile von *ciaR* deletiert sind, ist es nicht aktiv.

3.2.24 Inaktivierung des Serinproteasegens *htrA*

Für die Inaktivierung von *htrA*, wurde *htrA* in Frame gegen die Kanamycin Resistenzkassette *aphIII* (Trieu-Cuot und Courvalin, 1983) ausgetauscht. So wurden Effekte auf das downstream liegende und co-transkribierte Gen *parB* verhindert. Das *htrA::aphIII* Fragment wurde mittels der Primer *htrA-ko-6* und *SpoOJ1* (Tabelle 3.8) aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *htrA::aphIII* amplifiziert. Dieses Fragment wurde anschließend in verschiedene *S. pneumoniae* Stämme integriert und auf Kanamycin (Tabelle 3.14) selektioniert. Die erfolgreiche Integration wurde mittels PCR überprüft.

3.2.25 Inaktivierung von *spr1992*

Das Gen *spr1992* wurde mittels einer Kanamycin Resistenzkassette *apHIII* (Trieu-Cuot und Courvalin, 1983) ausgetauscht. Das *htrA::apHIII* Fragment wurde mittels der Primer *spr1992_KO5* und *spr1992_KO6* (Tabelle 3.9) aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *spr1992::apHIII* amplifiziert. Dieses Fragment wurde anschließend in verschiedene *S. pneumoniae* Stämme integriert und auf Kanamycin (Tabelle 3.14) selektioniert. Die erfolgreiche Integration wurde mittels PCR überprüft.

3.2.26 Inaktivierung von *murN*

Das Gen *murN* wurde mittels einer Erythromycinresistenzkassette (*ermAM*) deletiert. Die Resistenzkassette wurde mit den Primern *ermAM_KpnI* und *EcoRev_2* (Tabelle 3.12) aus dem Stamm *S. pneumoniae* RK1 (*ccnA::ermAM*) amplifiziert. Die flankierenden Bereiche wurden mittels der Primer *KO_murN1/KO_murN_2_kpn* und *KO_murN_3_Eco/Ko_murN_4* (Tabelle 3.12) aus R6 amplifiziert. Nach erfolgreichem Verdau und Ligation, erfolgte die Transformation in das entsprechende *S. pneumoniae* R6-Derivat. Selektioniert wurde auf Erythromycin (Tabelle 3.14). Die Überprüfung erfolgte mittels der Primer *Ko_murN_kontrol1* und *Ko_murN_kontrol2*.

4. Ergebnisse

4.1 Piperacillin-resistente Labormutanten und die Glycosyltransferase CpoA

Bei der Entwicklung von Resistenzen handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Prozess. Um diese Resistenzentstehung Schritt für Schritt nachvollziehen zu können, wurden mehrere unabhängige Familien von β -Lactamresistenten Labormutanten ausgehend von dem β -Lactam sensitiven *S. pneumoniae* R6 durch eine stufenweise erhöhte Antibiotikakonzentration selektioniert (Laible und Hakenbeck, 1987). Zur Selektion wurden zwei unterschiedliche β -Lactame verwendet, Piperacillin und Cefotaxim. Während Piperacillin mit PBP2b interagiert und eine rasche Zelllyse einleitet, zeigt Cefotaxim keine Interaktion mit diesem PBP und führt zu einer langsamen Abnahme der Lebendkeimzahl, einen Zustand, den man als Toleranz bezeichnet. In bis zu sechs Selektionsschritten entstanden so mehrere unabhängige Labormutantenfamilien.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutanten P104 und P106 sind die ersten Familienmitglieder der Piperacillin-resistenten Familien P004 und P006. Beide Labormutantenfamilien bestehen aus jeweils fünf Familienmitgliedern, die sich durch eine sukzessiv erhöhte MHK für Piperacillin auszeichnen. Die primären Targets der β -Lactame, die PBPs, sind in der P004-Familie erst ab der vierten, innerhalb der P006-Familie ab der zweiten Selektionsstufe von Mutationen betroffen. Die verminderte Empfindlichkeit gegenüber β -Lactamen korreliert in den hier gezeigten Labormutanten größtenteils mit Veränderungen in Nicht-PBP-Genen (Hakenbeck *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999; Meiers, 2011). Eine schematische Darstellung des Familienstammbaums, sowie die bereits identifizierten Resistenzdeterminanten können der Abbildung 4.1 entnommen werden.

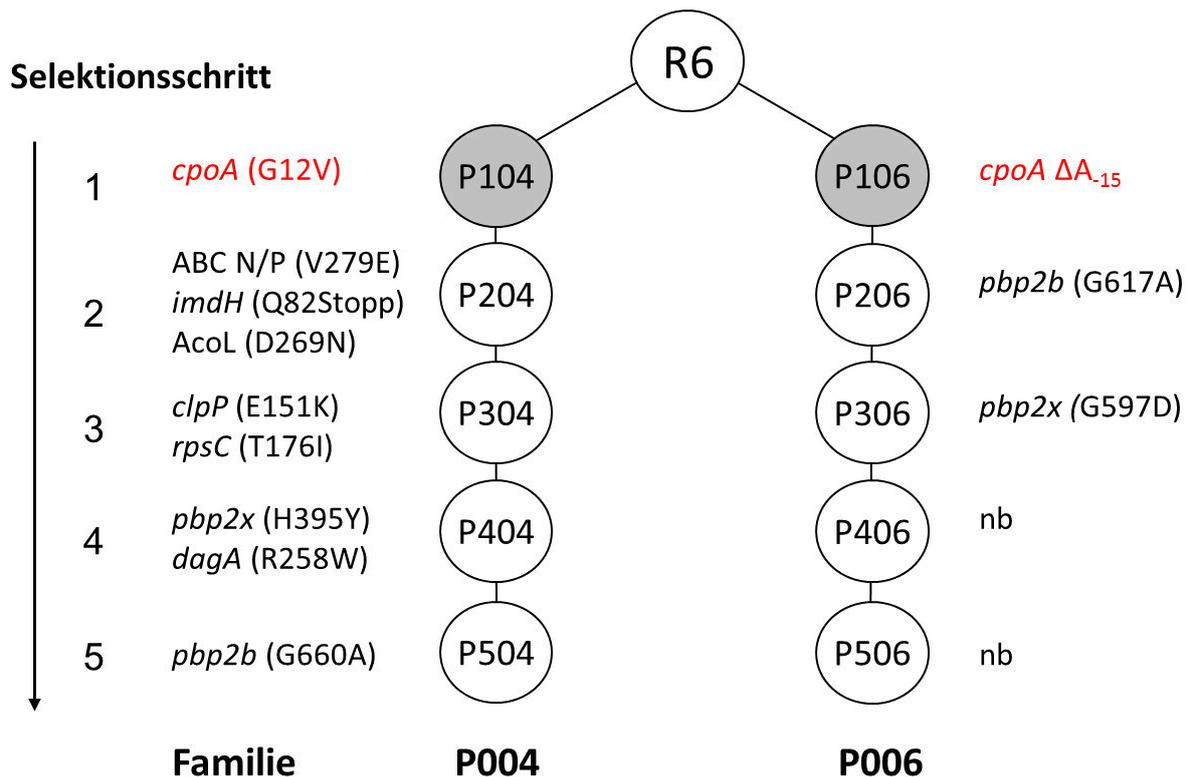


Abbildung 4.1: Die Mutantenfamilien P004 und P006

Die Stämme wurden ausgehend vom Wildtyp *S. pneumoniae* R6 in fünf Selektionsschritten mit ansteigender Piperacillinkonzentration selektioniert. Jeder abgebildete Kreis steht für einen Stamm innerhalb der Familie. Neben den Punkten ist das Gen, sowie der sich darin ereignete Aminosäureaustausch, angegeben. Die Stämme mit verändertem *cpoA* sind grau, die entsprechende Veränderung rot unterlegt. Nicht identifizierte Resistenzdeterminanten sind mit nb (nicht bekannt) gekennzeichnet. ABC N/P: ABC-Transporter, Substrat unbekannt; ImdH: Inosinmonophosphatdehydrogenase; AcoL: Dihydrolipoamiddehydrogenase; ClpP: Proteolytische Untereinheit einer caseinolytischen Protease; RpsC: 30 S ribosomales Protein; DagA: Alanin-Symporter-Protein

In beiden Familien ereigneten sich im ersten Selektionsschritt Veränderungen in dem putativen Glycosyltransferasegen *cpoA*. Während in P104 eine Punktmutation innerhalb von *cpoA* (GTA → GGA) einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin an Position 12 zur Folge hat, kam es in P106 zur Deletion eines Adenins, 15 Basenpaaren (bp) upstream des von Grebe *et al.* vermuteten *cpoA* Startcodons (Grebe *et al.*, 1997). Die beiden *cpoA*-Mutanten weisen eine vierfach erhöhte Resistenz gegenüber Piperacillin auf und wurden im Zuge früherer Arbeiten bereits teilweise charakterisiert (Leible *et al.*, 1987; Hakenbeck *et al.*, 1994; Grebe *et al.*, 1997; Volz, 2008; Meiers, 2011). Dabei zeigten Westernblotanalysen, dass P104 die gleiche Menge an CpoA wie R6 aufwies, während in P106 eine Detektion mittels polyklonaler Anti-CpoA-Antikörpern nicht möglich war (Grebe *et al.*, 1997).

4. Ergebnisse

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, die einen Einblick geben, welche Auswirkung diese *cpoA*-Veränderungen auf die Bakterienzelle haben.

Im Vorfeld dieser Analysen war es unabdingbar sich zunächst näher mit den Positionen zu befassen, die diese Veränderungen innerhalb des *cpoA*-Transkripts einnehmen. Eine exakte Bestimmung des *cpoA*-Startcodons war hierbei unablässig.

4.1.1. Bestimmung des Startcodons von CpoA

In P106 wurde eine Adenin-Deletion 15 bp upstream des von Grebe *et al.* vermuteten *cpoA* Startcodons (ATG₂) identifiziert. Grebe *et al.* vermuteten, dass diese Deletion Einfluss auf die Effektivität der Ribosomenbindung an das *cpoA* Transkript hat und somit das Scheitern einer Detektion von CpoA mittels polyklonaler Antikörper in P106 erklärt.

27 bp upstream von ATG₂, das keine klassische Shine Dalgarno Sequenz besitzt, befindet sich noch ein alternatives Startcodon (ATG₁), welches ebenfalls als Translationsstart fungieren kann. Upstream von ATG₁ kann eine perfekte -10 Region identifiziert werden.

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei ATG₁ oder ATG₂ um das CpoA-Startcodon handelt, wurde zunächst der *cpoA*-Transkriptionsstart kartiert (Volz, 2008). Das 5' Ende der *cpoA* mRNA wurde mittels Race (rapid amplification of cDNA ends) bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich 27 bp upstream von ATG₂ befindet. Bei dieser Position handelt es sich exakt um die Position des alternativen Startcodons (ATG₁).

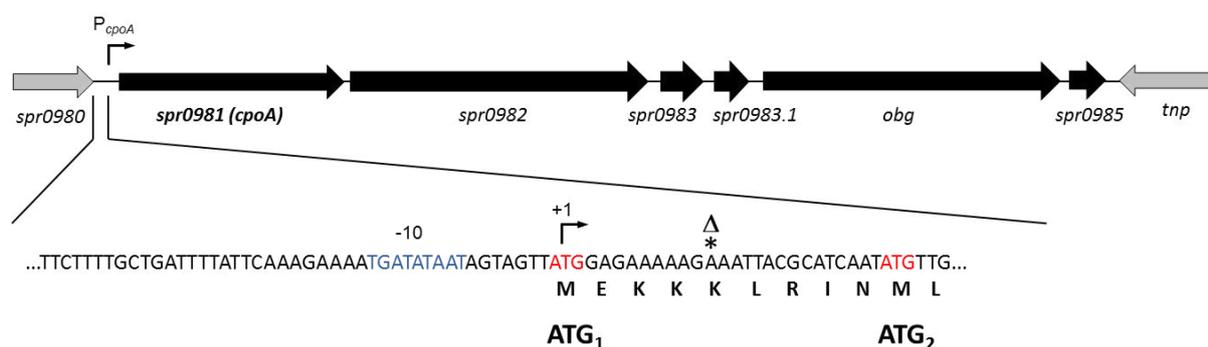


Abbildung 4.2: Genetische Organisation des CpoA-Operons

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz upstream von *cpoA*, sowie die vorhergesagte Peptidsequenz. Die erweiterte -10 Region ist blau, die beiden möglichen Startcodons sind rot markiert. Der Transkriptionsstart (+1) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Position der Adenindeletion, die sich in P106 ereignet hat, ist durch Δ* gekennzeichnet. Die dem CpoA-Operon zugehörigen Gene sind schwarz hervorgehoben.

4. Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit sollte überprüft werden, welches der beiden putativen Startcodons richtig ist und ob die Deletion in P106 Einfluss auf die Translationsinitiation hat oder zu einem Frameshift innerhalb des Leserasters führt.

Versuche zur Bestimmung des Translationsstartpunktes von CpoA waren bereits Gegenstand früherer Untersuchungen (Eisel, 2008). Damals wurde postuliert, dass es sich bei ATG₂ um den Translationsstartpunkt von CpoA handelt. Bei der translationellen Kopplung P_{cpoA}ATG₁(Eisel, 2008) alleine mit einem *lacZ* Reporter gen (pTP2) konnten keine Expressionsstärke mittels β -Galactosidaseassay ermittelt werden (Eisel, 2008).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde ein erneuter Versuch unternommen den Translationsstart von CpoA zu bestimmen. Bei der Betrachtung der Translationsfusionen von Eisel (2008) fiel auf, dass der vor *lacZ* klonierte Sequenzbereich bereits wenige Basenpaare nach ATG₁ endet (Abbildung 4.3, Primerpaar: PcpoA_Eco_f; PcpoA_Bam_r). Da Hinweise vorliegen, dass die downstream Sequenzen die Promotorstärke in vivo beeinflussen können (Kammerer *et al.*, 1986) und somit auch die Translation, wurde der vor *lacZ* klonierte Bereich in dieser Arbeit um rund 20 Nucleotide erweitert (Primerpaar: PcpoA_Eco_f; PcpoA_Bam_r1a). Eine schematische Darstellung der vor *lacZ* klonierten Sequenzbereiche kann der Abbildung 4.3 entnommen werden.

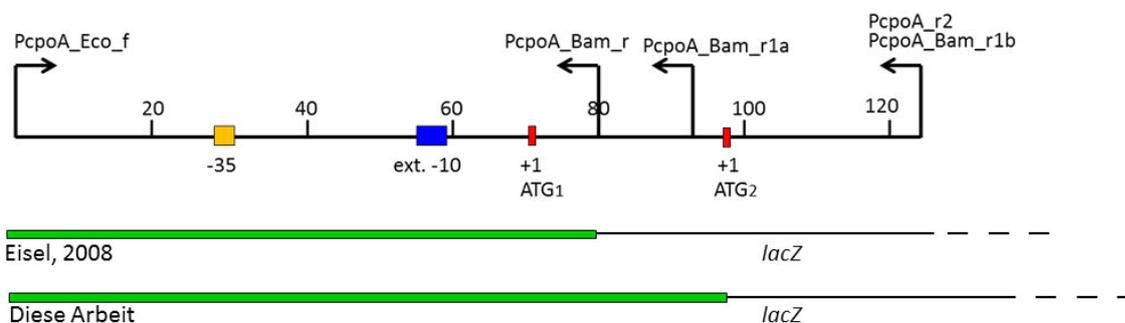


Abbildung 4.3: Vor das Reporter gen *lacZ* klonierte Sequenzbereiche

Schematische Darstellung der vor *lacZ* klonierten Sequenzbereiche von P_{cpoA}ATG₁(Eisel, 2008) und P_{cpoA}ATG₁. Die verwendeten Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die beiden möglichen Startcodons sind rot, die -10 Region blau, -35 Region gelb hinterlegt. Die grünen Balken kennzeichnen die vor *lacZ* klonierten Sequenzbereiche. Die Primerpaare PcpoA_Eco_f/PcpoA_Bam_r und PcpoA_Eco_f/PcpoA_Bam_r1a wurden zur Konstruktion von P_{cpoA}ATG₁(Eisel, 2008) bzw. P_{cpoA}ATG₁ verwendet. Die Primerpaare PcpoA_Eco_f/PcpoA_r2 und PcpoA_Eco_f/PcpoA_Bam_r1b wurden zur Konstruktion von P_{cpoA}-ATG_{1,2} bzw. P_{cpoA}-ATG₁ATA₂ verwendet.

Neben der translationellen Kopplung des Promotors P_{cpoA}ATG₁ alleine mit einem *lacZ* Reporter gen (pTP2), wurden noch zwei weitere Plasmide konstruiert. Hierbei wurde der Promotor P_{cpoA} zusammen mit beiden Startcodons, ATG₁ und ATG₂ (P_{cpoA}-ATG_{1,2}) (Eisel, 2008) fusioniert, zum anderen ATG₁ zusammen mit einem mutierten ATG₂ (P_{cpoA}-ATG₁ATA₂). Die drei Plasmide wurde in

4. Ergebnisse

S. pneumoniae R6 transformiert und die Expressionsstärke mittels β -Galaktosidaseassay bestimmt (Abbildung 4.4).

Die Aktivitätsmessung der Translationsfusionen P_{cpoA} -ATG_{1,2}, P_{cpoA} -ATG₁ATA₂ und P_{cpoA} -ATG₁ offenbarte, dass alle drei eine nahezu identische Stärke aufwiesen. Da sowohl das Fragment, indem ATG₂ mutiert wurde (P_{cpoA} -ATG₁ATA₂), als auch ATG₁ alleine (P_{cpoA} -ATG₁) eine deutlich messbare Aktivität aufweisen, lässt dies auf eine Translationsinitiation an ATG₁ schließen. Es handelt sich bei dem *cpoA*-Transkript folglich um eine leaderless mRNA.

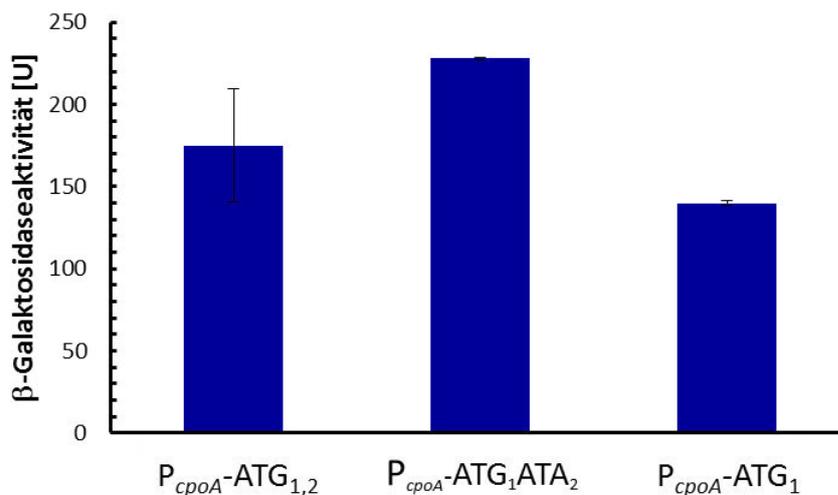


Abbildung 4.4: Expressionsstärke von P_{cpoA} -ATG_{1,2}, P_{cpoA} -ATG₁ATA₂, P_{cpoA} -ATG₁

Gezeigt ist die Aktivität der Reporterkonstrukte P_{cpoA} -ATG_{1,2}, P_{cpoA} -ATG₁ATA₂, P_{cpoA} -ATG₁. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Balken symbolisieren die Standardabweichungen. Die Stämme wurden im C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer OD₆₀₀=0,8 herangezogen. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Protein.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei ATG₁ um den Translationsstartpunkt von CpoA handelt. Die Adenindeletion befindet sich demnach in P106 innerhalb des *cpoA*-Gens. Sie führt zu einem Frameshift im 5. Codon, was in der Produktion eines Nonsense Peptids resultiert. Dies deckt sich mit dem von Grebe *et al.* (1997) beobachtete Scheitern einer Detektion von CpoA mittels polyklonaler Anti-CpoA-Antikörper in P106.

Die Verschiebung des Startcodons ändert auch die Position der Punktmutation in P104. Der Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin ereignete sich somit nicht, wie von Grebe *et al.* beschrieben, an Position 12, sondern an Position 21.

Nach Bestimmung des Translationsstartpunktes, sowie der genauen Position der Punktmutationen im *cpoA*-Transkript, wurde sich anschließend mit den phänotypischen Auswirkungen der *cpoA*-Veränderungen befasst.

4.1.2 Phänotypische Charakterisierung der *cpoA*-Mutanten

Im Folgenden werden die Labormutanten P104 und P106 auf ihr Lipidprofil (Glycolipide und Phospholipide), das Wachstum bei unterschiedlichen Bedingungen, sowie ihre Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien hin untersucht. Bei allen Charakterisierungen wurde eine von Volz, 2008 konstruierte *cpoA*-Deletionsmutante (*R6ΔcpoA*) mitgeführt. In dieser wurde das *cpoA*-Gen im Zuge einer in-frame Deletion mittels Januskonstruktion deletiert (Meiers *et al.*, 2014).

4.1.2.1 Das Lipidprofil der *cpoA*-Mutanten

4.1.2.1.1 Glycolipide

In früheren Arbeiten wurde die Glycosyltransferase CpoA biochemisch als α -Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin-Synthase beschrieben, die einen Galactosylrest von UDP-Galaktose auf GlcDAG überträgt und so das zweite Glycolipid von *S. pneumoniae* GalGlcDAG bildet (Berg *et al.*, 2001; Edman *et al.*, 2003).

Um diese in vitro Daten, in vivo zu überprüfen, sowie die Auswirkungen der Veränderungen in *cpoA* auf das Glycolipidprofil feststellen zu können, wurden die Membranlipide des Wildtyps R6 und der drei *cpoA*-Mutanten (P104, P106, *R6ΔcpoA*) isoliert und die Glycolipide nach Auftrennung durch eine 1-dimensionale Dünnschichtchromatographie spezifisch angefärbt (3.2.21). Die Isolation der Glycolipide, sowie die Detektion wurden bereits im Zuge einer Diplomarbeit (Meiers, 2011) durchgeführt. Die Darstellung mit den entsprechenden Standards fand zu Beginn der vorliegenden Arbeit statt. Zur Detektion des zweiten Glycolipides GalGlcDAG wurde als Standard Digalactosylglycosyldiacylglycerin (GalGalDAG) verwendet, der ein nahezu identisches Laufverhalten wie GalGlcDAG aufweist. In Abbildung 4.5 sind die Glycolipidprofile des Parentalstammes R6 und der *cpoA*-Mutanten dargestellt.

Nur bei dem Parentalstamm R6 können zwei Spots detektiert werden. Ein Spot befindet sich nahezu auf der Höhe des GalGalDAG Standards (S1) und ein weiterer Spot auf Höhe des zweiten Standards, GlcDAG. Aufgrund ihrer Lage können sie den beiden Glycolipiden von *S. pneumoniae* Monoglycosyldiacylglycerin (GlcDAG) und Galactosylglycosyldiacylglycerin (GalGlcDAG) zugeordnet werden. GalGlcDAG ist hierbei das mengenmäßig stärker vorkommende Glycolipid, was mit dem von Tatituri *et al.* (2012) beschriebenen Glycolipidverhältnis in *S. pneumoniae* von GlcDAG : GalGlcDAG von 1:2,5 übereinstimmt.

4. Ergebnisse

Bei P104, P106 und R6 Δ *cpoA* kann nur ein Spot, auf Höhe von GlcDAG, dem ersten Glycolipid, detektiert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der bereits *in vitro* beschriebenen GalGlcDAG-Synthase Aktivität von CpoA (Berg *et al.*, 2001; Edman *et al.*, 2003) und der Beteiligung der Glycosyltransferase an der Synthese des zweiten Glycolipides (GalGlcDAG). Dieses Ergebnis zeigt, dass weder P104, noch P106 im Besitz eines funktionellen CpoAs zu sein scheinen.

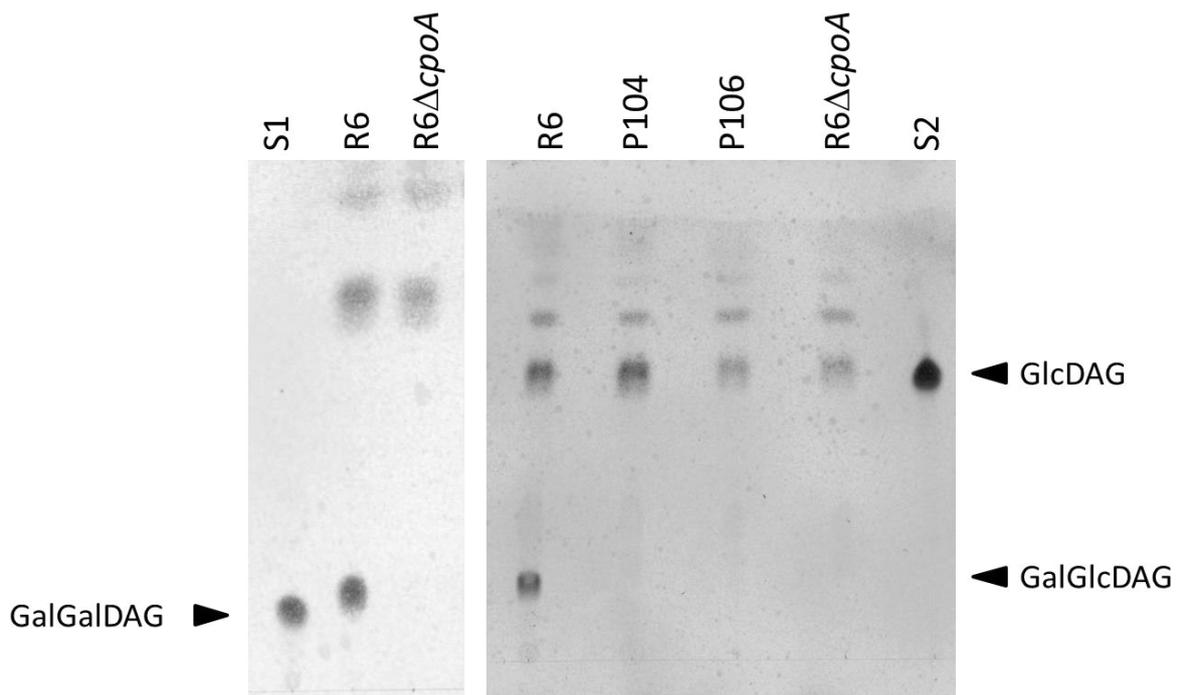


Abbildung 4.5: Glycolipidprofil von R6, P104, P106 und R6 Δ *cpoA*

Die Lipide des Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und den *cpoA*-Mutanten P104, P106 und R6 Δ *cpoA* wurden extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (Chloroform/Methanol/Essigsäure = 80:15:8) aufgetrennt. Als Standards wurden GalGalDAG (S1) und GlcDAG (S2) verwendet. Zur Visualisierung der Glycolipide wurden die Dünnschichtchromatographieplatten mit einem Naphtolgemisch (3.2.21) eingesprüht.

4.1.2.1.2 Phospholipide

Die Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* besteht neben den beiden Glycolipiden GlcDAG und GalGlcDAG aus den Phospholipiden Cardiolipin (CL) und Phosphatidylglycerin (PG).

In 4.1.2.1.1 konnte bereits gezeigt werden, dass keine der *cpoA*-Mutanten eine detektierbare Menge an GalGlcDAG aufweist. Daraufhin wurde untersucht, ob die Änderung der Glycolipidzusammensetzung auch Einfluss auf das Phospholipidprofil der Cytoplasmamembran hat. Hierzu wurden die Lipide des Wildtyps R6, sowie der drei *cpoA*-Mutanten isoliert und über eine

4. Ergebnisse

zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und spezifisch angefärbt (3.2.22). Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Während im Parentalstamm R6 Cardiolipin das Hauptphospholipid darstellt, weisen alle *cpoA*-Mutanten eine signifikant erhöhte Menge an Phosphatidylglycerin im Vergleich zu Cardiolipin auf.

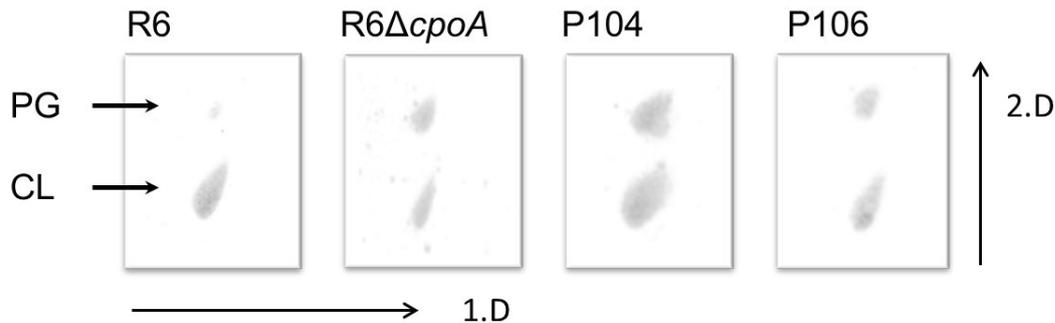


Abbildung 4.6: Phospholipidprofil von R6, P104, P106 und R6 Δ *cpoA*

Die Lipide wurden von dem Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und den *cpoA*-Mutanten P104, P106 und R6 Δ *cpoA* extrahiert und mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (erste Dimension: CHCl₃/MeOH/H₂O= 65:25:4, zweite Dimension: CHCl₃/AcOH/MeOH/H₂O= 80:14:10:3) aufgetrennt. Zur Darstellung der Phospholipide wurden die Dünnschichtchromatographieplatten mit Molybdenum Blue Spray eingefärbt. PG: Phosphatidylglycerin, CL: Cardiolipin.

Um eine einwandfreie Identifikation der beiden Spots gewährleisten zu können, wurde eine erneute zweidimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt, bei der die beiden Standards der Phospholipide CL und PG aufgetragen wurden. Nach der spezifischen Färbung der Chromatographieplatten konnten diese Spots mit dem Phospholipidprofil von R6 verglichen werden. Die hierbei erzielten Ergebnisse können der Abbildung 4.7 entnommen werden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Spots bei *S. pneumoniae* R6 das gleiche Laufverhalten wie die beiden Standards aufweisen und demnach zweifelsfrei als die beiden Phospholipide identifiziert werden können.

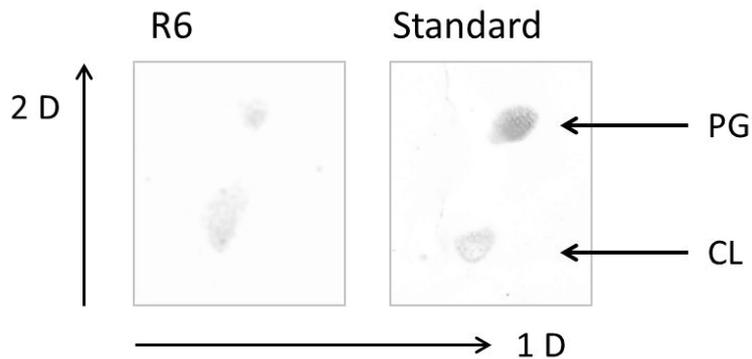


Abbildung 4.7: Standard Phospholipide

Die Lipide wurden extrahiert und mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (erste Dimension: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 65:25:4$, zweite Dimension: $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 80:14:10:3$) aufgetrennt. Zur Darstellung der Phospholipide wurden die Dünnschichtchromatographieplatten mit Molybdenum Blue Spray eingefärbt. PG: Phosphatidylglycerin, CL: Cardiolipin. Als Standard wurde CL, $0,17 \mu\text{mol}$ und PG, $0,3 \mu\text{mol}$ aufgetragen.

4.1.2.2 Der pleiotrope Phänotyp der *cpoA*-Mutanten

Durch Leible *et al.*, 1987 und Grebe *et al.*, 1997 konnten bereits einige Phänotypen, die im Zusammenhang mit Veränderungen in CpoA stehen, aufgedeckt werden. Hierzu zählte neben einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber β -Lactamantibiotika, eine Minderung der natürlichen Kompetenz, sowie eine verminderte PBP1a-Menge.

Im Zuge dieser Arbeit wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss darüber liefern sollen, ob eine veränderte Lipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran Einfluss auf andere, mit der Zellhülle in Zusammenhang stehenden Funktionen hat. Hierzu zählen, neben dem Wachstum bei niedrigen pH-Werten, der Einfluss von zweiwertigem Magnesium, sowie die Triton-induzierte Zellyse. Auf diese Untersuchungen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

4.1.2.2.1 Das Wachstum der *cpoA*-Mutanten

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp R6 untersucht. Zur Bestimmung der Generationszeit wurden der Parentalstamm R6 und die drei *cpoA*-Mutanten (P104, P106, $\text{R6}\Delta\text{cpoA}$), wie in 3.2.1.1 beschrieben, in C+Y-Medium (pH 7,8) herangezogen, ihr Wachstum gemäß 3.2.1.1 dokumentiert und in Abbildung 4.8 dargestellt.

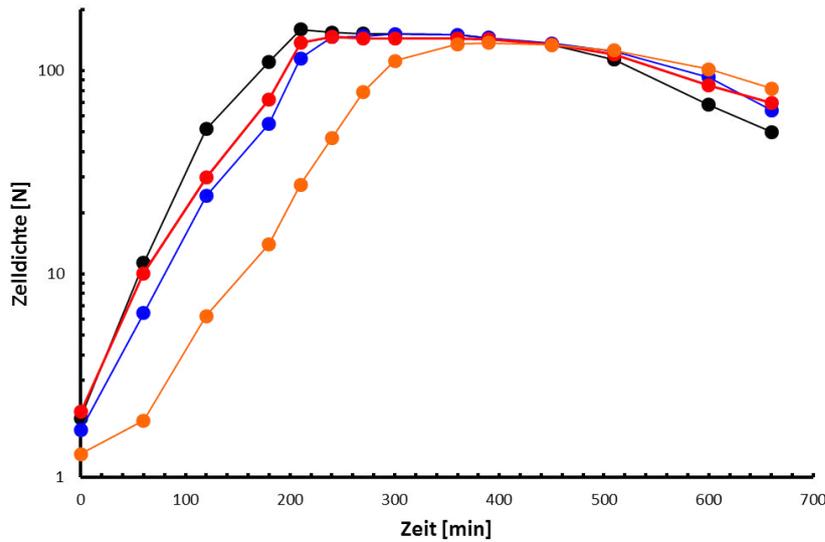


Abbildung 4.8: Wachstum von R6 und den *cpoA*-Mutanten

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten des Wildtyps R6, P104, P106 und R6Δ*cpoA*. Das Wachstum erfolgte im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Zelldichte wurde in Nephelometrieinheiten [N] als Funktion der Zeit [min] aufgetragen. Die hier gezeigten Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar. • R6, • P104, • P106, • R6Δ*cpoA*

Alle *cpoA*-Mutanten zeichnen sich durch ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp R6 aus. Die Generationszeiten können der Tabelle 4.1 entnommen werden. Bei der *cpoA*-Deletionsmutante wurde mit 43 min die höchste Generationszeit beobachtet. Die Generationszeiten von P104 und P106 liegen mit 33 bzw. 36 min nur knapp oberhalb des Wildtypes R6 (30 min).

Tabelle 4.1: Generationszeiten von R6 und den *cpoA*-Mutanten

Stamm/Mutante	Generationszeit g [min]
R6	30
P104	33
P106	36
R6Δ <i>cpoA</i>	43

4.1.2.2.2 Das Wachstum der *cpoA*-Mutanten bei niedrigem pH-Wert - Empfindlichkeit gegenüber Säurestress

Zur Untersuchung des Wachstums der *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp R6 bei unterschiedlichen pH-Werten wurden Kulturen aller vier Stämme in C+Y-Medium (pH 8) und C+Y-Medium (pH 6) gemäß 3.2.1.1 herangezogen, ihr Wachstum dokumentiert und in Abbildung 4.9 dargestellt.

Die Wachstumsexperimente bei unterschiedlichen pH-Werten offenbarten bei allen drei *cpoA*-Mutanten eine verminderte Säuretoleranz. Während der Wildtyp R6 in C+Y-Medium (pH 6) nur eine minimal verlangsamte Wachstumsrate im Vergleich zum Wachstum im C+Y-Medium (pH 8) aufwies, so wuchsen alle *cpoA*-Mutanten bei niedrigem pH-Wert deutlich langsamer. Am ausgeprägtesten zeigte sich dieser Phänotyp bei der *cpoA*-Deletionsmutante.

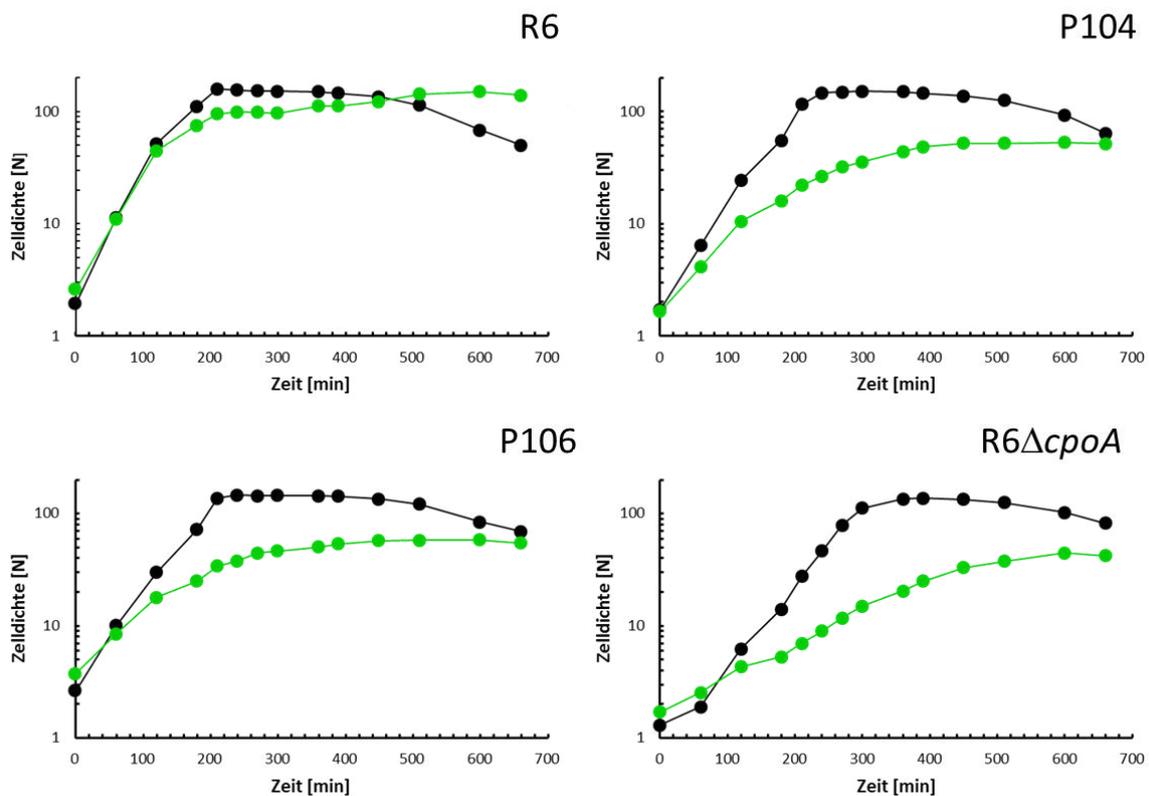


Abbildung 4.9: Wachstum der *cpoA*-Mutanten bei niedrigen pH-Werten

Dargestellt ist das Wachstum der *cpoA*-Mutanten und des Wildtyps R6 in C+Y-Medium (pH 8) (•), sowie in C+Y-Medium (pH 6) (•). Die Zelldichte wurde in Nephelometrieinheiten [N] als Funktion der Zeit [min] aufgetragen. Die hier gezeigten Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar.

4.1.2.2.3 Der Mg^{2+} -Bedarf der *cpoA*-Mutanten

Um die Abhängigkeit des Wachstums von zweiwertigen Magnesiumionen (Mg^{2+}) zu überprüfen, wurden die Kulturen von R6 und den *cpoA*-Mutanten in C+Y-Medium (pH 6) mit zwei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen herangezogen. Die Ergebnisse dieses Wachstumsexperiments können der Abbildung 4.10 entnommen werden.

Es zeigt sich, dass die doppelte Menge an verfügbaren Mg^{2+} -Ionen bei allen drei *cpoA*-Mutanten zu einer Verringerung der Generationszeit führt. Der durch den niedrigen pH-Wert verursachte Wachstumsdefekt konnte teilweise wieder aufgehoben werden. Dieser Kurierungseffekt war bei $R6\Delta cpoA$ am stärksten ausgeprägt.

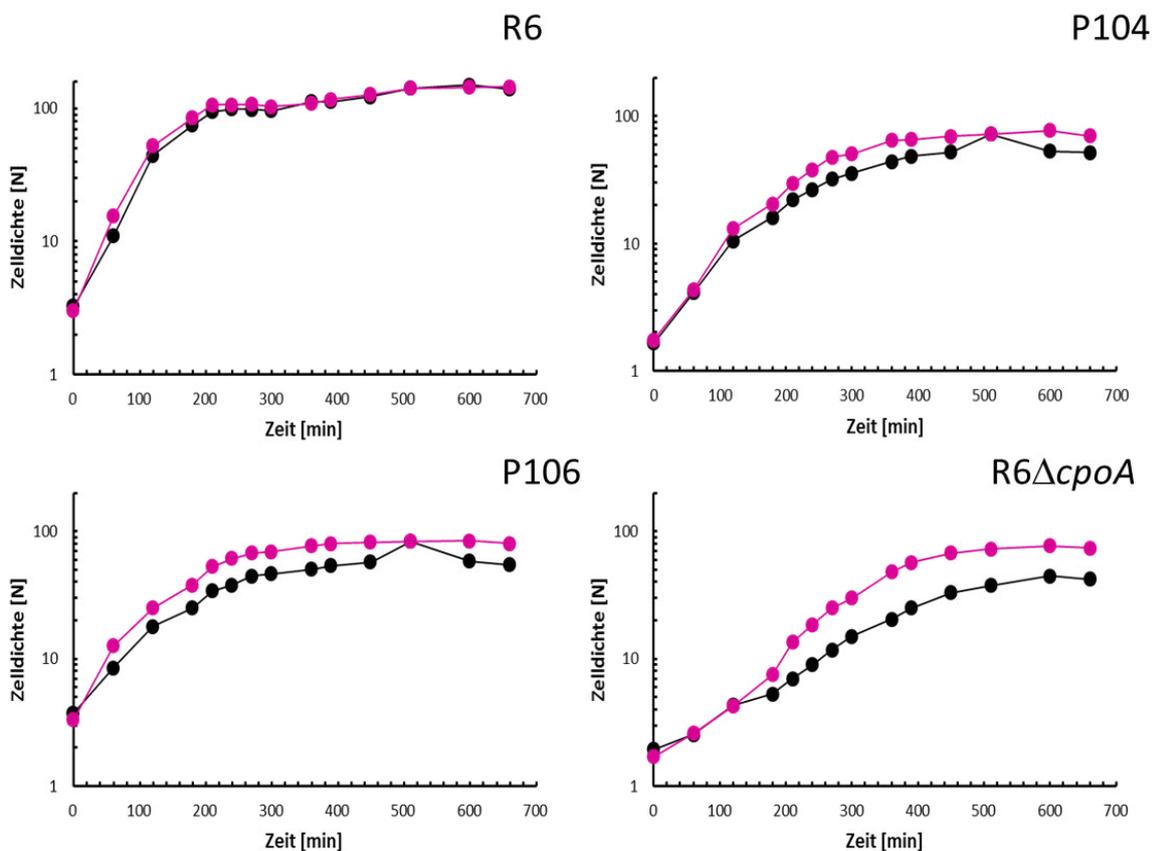


Abbildung 4.10: Einfluss der Mg^{2+} -Ionenkonzentration auf das Wachstum der *cpoA*-Mutanten bei niedrigem pH-Wert

Dargestellt ist das Wachstum der *cpoA*-Mutanten und des Wildtyps R6 in C+Y-Medium (pH 6) (●) [Endkonzentration $MgCl_2$: 0,195 mg/ml], sowie in C+Y-Medium (pH 6) mit doppelter Mg^{2+} -Ionenkonzentration [Endkonzentration $MgCl_2$: 0,39 mg/ml] (•). Die Zellidichte wurde in Nephelometrieinheiten [N] als Funktion der Zeit [min] aufgetragen. Die hier gezeigten Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar.

4.1.2.2.4 Das Lyseverhalten der *cpoA*-Mutanten

Detergenzien wie Triton-X-100 können ähnlich wie Piperacillin den LytA-abhängigen Lysemechanismus induzieren. In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, inwiefern sich die Autolyse der *cpoA*-Mutanten, von der des Wildtyps R6 unterscheidet. Hierzu wurden die Stämme in C+Y-Medium (pH 7,8) herangezogen. Die Triton-X-100-Zugabe [Endkonzentration: 0,01%] erfolgte, nachdem die Zellen eine OD_{600} von 0,5 erreicht hatten. Das Lyseverhalten wurde durch Messung der optischen Dichte verfolgt und in Abbildung 4.11 dargestellt. Aufgrund von technischen Problemen bei der Messung des Bakterienwachstums mittels Nephelometer erfolgte hier, sowie im späteren Verlauf dieser Arbeit die Messung des Wachstums durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer.

Es zeigt sich, dass alle *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm R6 langsamer lysieren. Die OD_{600} -Werte von R6 fielen bereits 25 min nach Triton-X-100-Zugabe unterhalb von 0,1, während sich die Zelldichte der *cpoA*-Mutanten auch nach 180 min noch oberhalb dieses Wertes befanden. Unterschiede im Lyseverhalten von P104, P106 und $R6\Delta cpoA$ konnten nicht beobachtet werden.

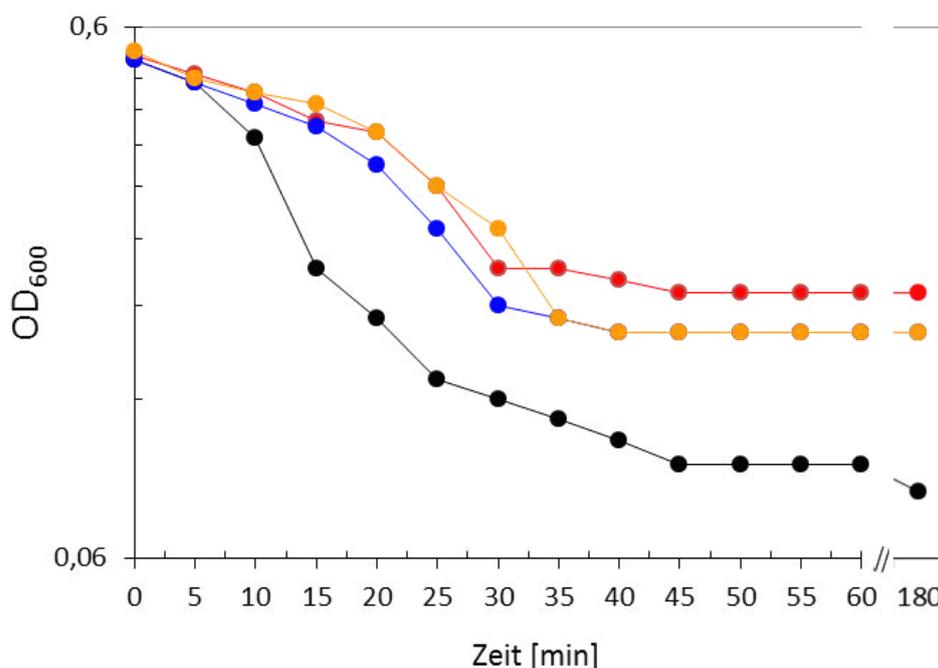


Abbildung 4.11: Triton-X-100 induzierte Zellyse der *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp R6
 Aufgetragen ist die Zelldichte [OD_{600}] als Funktion der Zeit [min], ab dem Zeitpunkt der Triton-X-100-Zugabe. Die Zugabe [Endkonzentration= 0,01%] erfolgte, nachdem die Kulturen eine Zelldichte von $OD_{600}= 0,5$ im C+Y-Medium (pH 7,8) erreicht hatten. Die hier gezeigten Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar. ●=R6; ●=P104; ●=P106; ●= $R6\Delta cpoA$

4.1.2.2.5 Der Kompetenzphänotyp der *cpoA*-Mutanten

Ein Defekt in der genetischen Kompetenz in P104 und P106 konnte bereits von Grebe *et al.* (1997) beobachtet werden und wurde auch für $R6\Delta cpoA$ beschrieben (Volz, 2008). Die Transformationseffizienz lag dabei deutlich unterhalb der des Parentalstammes R6.

In dieser Arbeit wurden erneute Untersuchungen zum Kompetenzphänotyp der *cpoA*-Mutanten durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Transformationseffizienzen von P104 und P106 im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt und mit denen des Parentalstammes R6 verglichen. Als Transformationsmarker wurde *Strep^R* (*rpsL41*) verwendet, der den Zellen Streptomycinresistenz verleiht. Die Bestimmung der Transformationseffizienz für P104 und P106 wurde gemäß, der in 3.2.2.3 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt und die dabei erzielten Ergebnisse in Abbildung 4.12 dargestellt.

Es zeigt sich, dass bei beiden *cpoA*-Mutanten, die Transformationseffizienz deutlich unterhalb von R6 liegt. Während der Wildtyp über die komplette exponentielle Phase hinweg kompetent ist, so weisen P104 und P106 nur in der frühen exponentiellen Phase einen Kompetenzpeak auf. Die Transformationseffizienzen der *cpoA*-Mutanten konnten bei keiner Zelldichte den Wert des Parentalstammes R6 erreichen und lagen durchschnittlich zwei Zehnerpotenzen darunter. Eine Untersuchung der Transformationseffizienz für die *cpoA*-Deletionsmutante wurde bereits von Volz (2008) durchgeführt. Die Transformierbarkeit lag auch, wie bei P104 und P106 beobachtet deutlich unterhalb der des Parentalstammes und beschränkte sich auf die frühe exponentielle Wachstumsphase.

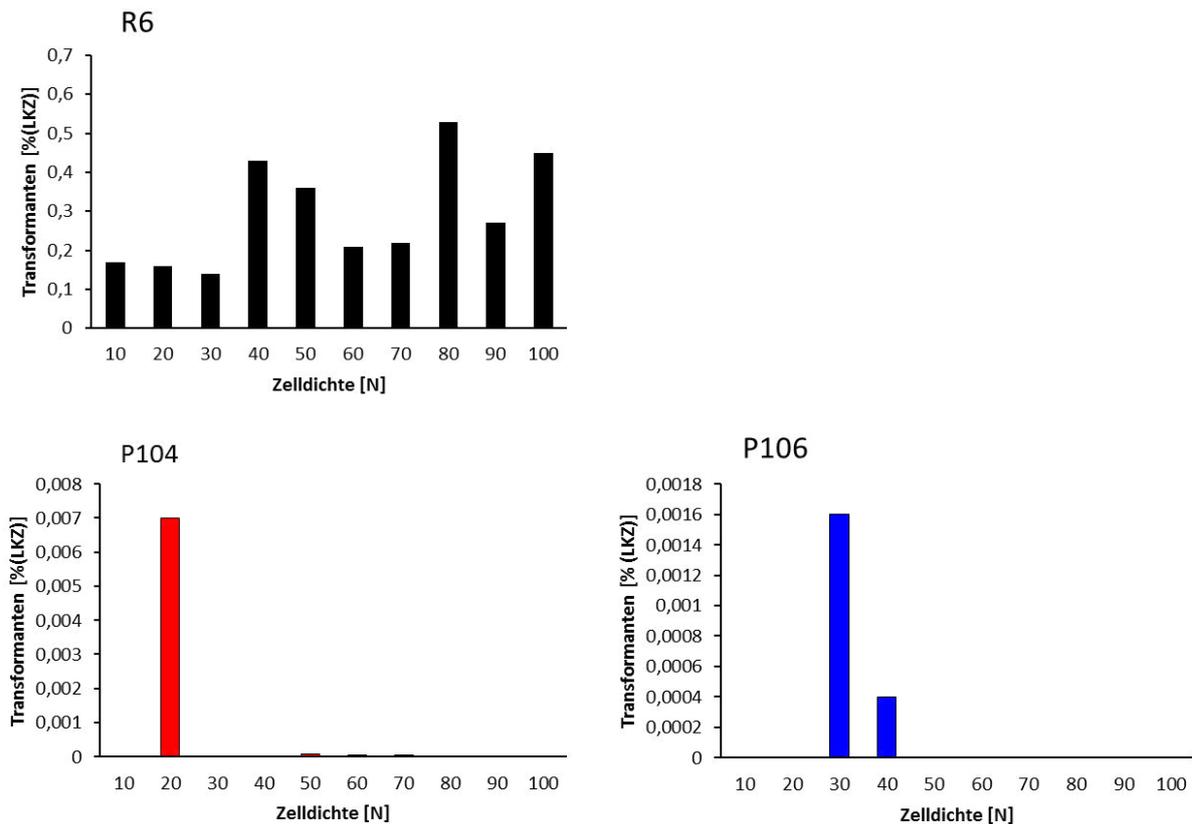


Abbildung 4.12: Transformationseffizienz von R6, P104 und P106

Dargestellt sind die Transformationseffizienzen von R6, P104 und P106 als prozentualer Anteil der Lebendkeimzahl [% (LKZ)] in Abhängigkeit der Zelldichte [N]. Die Transformationseffizienz wurde mit Hilfe des Transformationsmarkers *rpsL41*, der Streptomycinresistenz vermittelt, bestimmt. Die Anzucht der Stämme erfolgte im C+Y-Medium (pH 7,8). ■ R6, ■ P104, ■ P106

4.1.2.2.6 Resistenz gegenüber Bacitracin

Aus früheren Arbeiten (Grebe *et al.* 1997; Volz, 2008) war bereits bekannt, dass die *cpoA*-Mutanten eine vierfach erhöhte Resistenz gegenüber ihrem Selektionsantibiotikum Piperacillin aufweisen. Im Zuge dieser Arbeit wurde noch ein weiteres, die Mureinbiosynthese inhibierendes Antibiotikum, das Bacitracin, getestet.

Das Polypeptidantibiotikum wirkt hemmend auf die Zellwandsynthese, indem es den Membrantransport der Peptidoglykanbausteine durch den Lipidcarrier Bactoprenol blockiert.

Die Bestimmung der MHK für Bacitracin ergab, dass alle *cpoA*-Mutanten deutlich sensitiver gegenüber diesem Antibiotikum sind, als der Parentalstamm R6. Während R6 eine MHK von 8 µg/ml aufweist, wird das Wachstum von P104, P106 und R6Δ*cpoA* bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml gehemmt (Abbildung 4.13).

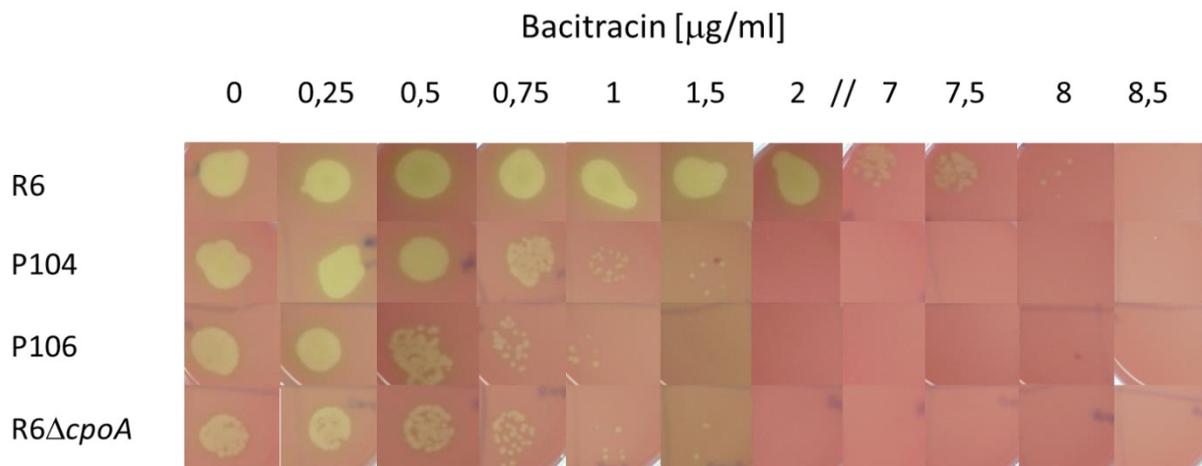


Abbildung 4.13: Auswirkung der *cpoA*-Veränderungen auf die Bacitracinresistenz

Gezeigt sind die Ergebnisse des Tropfentest zur Bestimmung der MHK für Bacitracin für die Stämme R6, P104, P106 und R6 Δ *cpoA*. Die Inkubation der Stämme fand im C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,3$ statt, anschließend wurde 1:1000 in 0,9%iger NaCl verdünnt und 30 μl dieser Verdünnung auf die D-Blutagarplatte getropft und die Platten 48h bei 37°C inkubiert. Die durch α -Hämolyse grün verfärbten Stellen der Agarplatten kennzeichnen die Bereiche des Bakterienwachstums.

4.1.3 Die Glycosyltransferase CpoA und das Zweikomponentensystem CiaRH

Durch die vorangegangenen Versuche konnte bereits gezeigt werden, dass die *cpoA*-Mutationen zu einer Veränderung der Membranlipidzusammensetzung geführt haben. Aufgrund der gezeigten Phänotypen infolge der *cpoA*-Veränderungen, wie die verminderte Zellyse, ein verlangsamtes Wachstum bei niedrigen pH-Werten, sowie eine veränderten Sensitivität gegenüber Antibiotika, die in die Mureinbiosynthese eingreifen, können auch Veränderungen an der Zellwand nicht ausgeschlossen werden.

Schädigungen der Zellhülle wurden bereits als Signal für die Histidinkinase CiaH des Zweikomponentensystem CiaRH diskutiert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass ein aktiviertes CiaRH-System sich auf die Lyse durch Zellwandinhibitoren wie Bacitracin auswirkt und eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Detergenzien vermittelt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008; Moscoso *et al.*, 2010).

Aus diesem Grund wurde die Aktivität des Zweikomponentensystems in den *cpoA*-Mutanten und dem Parentalstamm R6 untersucht. Die Aktivitätsbestimmung von CiaR fand indirekt über die Messung des stark CiaR-abhängigen Promotors P_{htrA} statt. Dieser Promotor wurde als Promotor-*lacZ*-Fusion über das Plasmid pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae* integriert und die Promotoraktivität

4. Ergebnisse

über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.14 aufgeführt.

Es zeigt sich, dass alle *cpoA*-Mutanten die gleiche Expressionsstärke von P_{htrA} wie R6 aufweisen. Eine erhöhte Aktivität des CiaRH-Systems konnte nicht beobachtet werden.

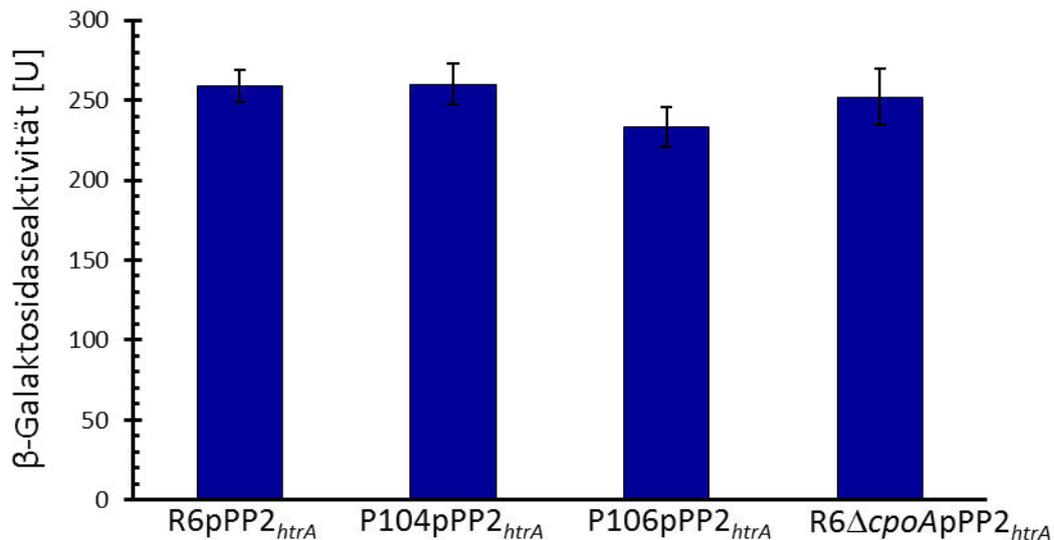


Abbildung 4.14: Durch P_{htrA} vermittelte β -Galactosidaseaktivität in R6, P104, P106 und R6 Δ cpoA

Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600}=0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die schwarzen Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. Die Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

4.1.4 Die Membranverankerung von CpoA in P104

Die phänotypische Charakterisierung von P104 und P106 zeigte, dass sie in Bezug auf Wachstum, Säureempfindlichkeit, Lyseverhalten und dem Bedarf an zweiwertigem Magnesium den gleichen Phänotyp wie die *cpoA*-Deletionsmutante aufwiesen. Zusammen mit der Tatsache, dass in den Chromatographiestudien bei beiden Mutanten kein GalGlcDAG zu detektieren war, legt nahe, dass weder P104 noch P106 im Besitz eines funktionellen CpoAs sind. Im Falle von P106 ist dies leicht nachvollziehbar. Durch die Deletion eines Adenosinrestes im fünften Codon kam es zu einem Frameshift, der in der Produktion eines Nonsense Proteins resultierte. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Grebe *et al.*, (1997), dass kein CpoA mittels polyklonalen Anti-CpoA-Antikörpern in P106 detektiert werden konnte. P104 zeigt hingegen die gleiche CpoA-Menge wie der Wildtyp R6 auf (Grebe *et al.*, 1997). Die Frage, warum CpoA nicht mehr funktionell ist, lässt sich nicht

4. Ergebnisse

einfach beantworten. Glycosyltransferasen der GT1-YqgM-like-Familie sind über einen zweistufigen Prozess an die Membran gebunden, bei dem sowohl elektrostatische Anziehungskräfte, wie auch hydrophobe Wechselwirkungen einen Rolle spielen (Li *et al.*, 2003). Aufgrund der Lage des Aminosäureaustausches (Glc21Val) am N-terminalen Ende von CpoA, ist eine Beeinflussung der Membranbindung der Glycosyltransferase naheliegend. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Membran-, sowie die cytoplasmatische Fraktion von R6, P104 und R6 Δ *cpoA* mittels Ultrazentrifugation, wie in 3.2.19 beschrieben isoliert. Durch den Nachweis von CpoA mittels polyklonaler Antikörper sollte überprüft werden, ob die Punktmutation in P104 einen Verlust der Membranverankerung von CpoA verursacht.

Die Westernblotanalysen (Abbildung 4.15) zeigten, dass in P104, ebenso wie in R6 CpoA in der Membranfraktion detektiert werden konnte. Für R6 Δ *cpoA*, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, ist erwartungsgemäß keine Bande auf Höhe von CpoA zu erkennen.

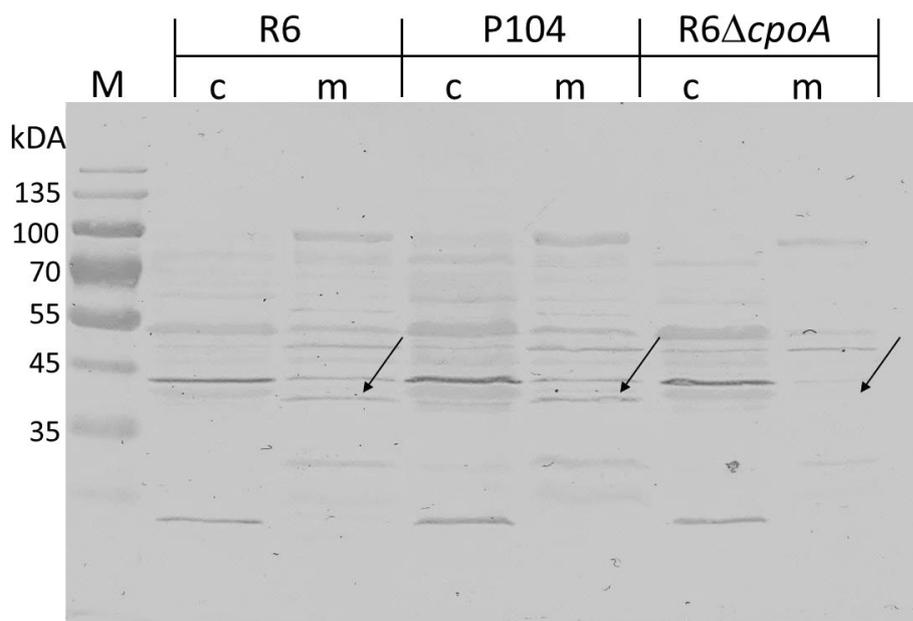


Abbildung 4.15: Membranverankerung von CpoA

Gezeigt sind Westernblotanalysen zur Detektion von CpoA in der cytoplasmatischen (c) und der Membranfraktion (m) des Parentalstammes R6 und den *cpoA*-Mutanten P104 und R6 Δ *cpoA*. Die Trennung der cytoplasmatischen Proteine von der Membranfraktion erfolgte über Ultrazentrifugation, wie in 3.2.18 beschrieben. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Der primäre Antikörper (Anti-CpoA) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt, der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit) in einer Verdünnung von 1:30.000. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde der pEqGoldIV Marker (M) aufgetragen. Das berechnete Molekulargewicht von CpoA beträgt 43 kDA. Die Pfeile kennzeichnen die Position von CpoA in der Membranfraktion von R6 und P104, sowie die Abwesenheit von CpoA in R6 Δ *cpoA*.

4.1.5 Globale Transkriptionsanalyse der *cpoA*-Mutanten

Um einen tieferen Einblick zu erhalten, welche Auswirkungen ein verändertes Lipidverhältnis der Cytoplasmamembran hat, wurden Microarray-basierte Transkriptionsanalysen (3.2.18) der Mutanten P104, P106 und R6 Δ *cpoA* durchgeführt und das Transkriptom dieser drei *cpoA*-Mutanten mit dem des Wildtyps R6 verglichen.

Wie in 4.1.2.2.5 gezeigt, weisen alle *cpoA*-Mutanten eine deutlich eingeschränkte Transformierbarkeit im Vergleich zum Parentalstamm R6 auf. Um Schwankungen des äußerst komplexen Kompetenzregulons zu vermeiden, wurde die bei der Transkriptionsanalyse eingesetzte Gesamt-RNA aus Zellen gewonnen, die unter nicht kompetenten Bedingungen, bei pH 6,8 in C+Y-Medium angezogen wurden. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bis zu einer Zelldichte von N= 40.

Gene wurden nur dann als signifikant verändert angesehen, wenn ihr relativer Unterschied kleiner oder gleich 0,33, beziehungsweise größer oder gleich 3 war und sie einen P-Wert von < 0,03 aufwiesen.

Von den 2038 R6 spezifischen Genen auf dem Oligo-Slide zeigten in P104 48, in P106 103 und in R6 Δ *cpoA* 43 Gene ein signifikant verändertes Transkriptverhältnis im Vergleich zum Parentalstamm R6. Eine vollständige Auflistung der bei der Transkriptomanalyse erzielten Ergebnisse der einzelnen *cpoA*-Mutanten ist im Anhang aufgeführt.

In der Tabelle 4.2 sind die Gene mit signifikant verändertem Transkriptverhältnis aufgelistet, die in allen drei *cpoA*-Mutanten identifiziert werden konnten.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.2: Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in P104, P106 und R6 Δ *cpoA*

Gen-Nr. in R6	Gene	Produkt	Transkriptmenge Mutante/R6			
			P104	P106	R6 Δ <i>cpoA</i>	
<i>spr0276</i>	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,16	0,11	0,04	
<i>spr0277</i>		Conserved hypothetical protein	0,15	0,15	0,05	
<i>spr0278</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,18	0,27	0,21	
<i>spr0279</i>		<i>bglG</i>	Transcription antiterminator BglG family	0,22	0,26	0,2
<i>spr0280</i>			Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,33	0,2	0,21
<i>spr0281</i>			Hypothetical protein	0,27	0,14	(1
<i>spr0282</i>			Phosphotransferase system sugar-specific EII component	(1	0,24	0,19
<i>spr0307</i>	<i>clpL</i>		3,97	3,35	6,16	
<i>spr0524</i>	<i>vex1</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	8,71	6,04	7,33	
<i>spr0525</i>	<i>vex2</i>	ABC transporter ATP-binding protein - Pep export	5,16	3,71	↑	
<i>spr0526</i>	<i>vex3</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	7,53	4,36	3	
<i>spr1545</i>		Hypothetical protein	0,25	0,32	(2	
<i>spr1546</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,25	↓	0,28	
<i>spr1547</i>		Hypothetical protein	0,21	↓	0,19	
<i>spr1548</i>		Hypothetical protein	0,32	↓	0,15	
<i>spr1549</i>		Hypothetical protein	0,27	↓	0,19	
<i>spr1558</i>		Conserved hypothetical protein	↑	3,57	4,16	
<i>spr1559</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	3,37	4,77	5,19	
<i>spr1560</i>		Hypothetical protein	↑	3,9	4,81	

Dargestellt sind die Gene der *cpoA*-Mutanten P104, P106 und R6 Δ *cpoA* mit einer signifikant veränderten Transkriptmenge im Vergleich zum Parentalstamm R6. Gene wurden dann als signifikant angesehen, wenn sie ein mindestens dreifach erniedrigtes bzw. ein dreifach erhöhtes Transkriptverhältnis gegenüber dem Vergleichsstamm aufwiesen und einen P-Value von unter 0,03 besaßen. Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus einer in C+Y-Medium (pH 6,8) exponentiell wachsender Kultur bei einer Zelldichte von N=40 extrahiert. 1) nicht detektierbar, 2) nicht signifikant. Die Pfeile deuten auf ein niedrigeres (↓) bzw. ein höheres (↑) Transkriptverhältnis im Vergleich zu R6, aber unterhalb der Signifikanzgrenze hin.

Aus der Tabelle 4.2 geht hervor, dass alle *cpoA*-Mutanten, vier Gencluster und ein einzelnes Gen (*clpL*) in signifikant veränderten Transkriptmengen im Vergleich zum Parentalstamm R6 aufweisen. Keine unterschiedlichen mRNA-Mengen konnten in Genen, die für die PBP's oder den Lipidstoffwechsel codierten detektiert werden.

Im Folgenden wird auf die veränderten Gencluster, sowie *clpL* im Detail eingegangen.

4.1.5.1 Detaillierte Betrachtung der innerhalb der Transkriptomanalyse signifikant veränderten Gene

Innerhalb der globalen Transkriptomanalyse konnte vier Gencluster, sowie ein einzelnes Gen (*clpL*) identifiziert werden, die eine signifikant veränderte Transkriptmenge in allen *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm R6 aufwiesen. Vor allem Membranproteine, wie PTS-Systeme und ABC-Transporter, waren betroffen.

Das Operon *spr0276-spr0282* ist in allen *cpoA*-Mutanten zum Teil stark runterreguliert. Man vermutet, dass es an der Verwertung von Cellobiose in *S. pneumoniae* beteiligt ist und unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems TCS08 von *S. pneumoniae* steht (McKessar und Hakenbeck, 2006).

Die Gene des Clusters *spr0524-spr0526* zeigen in allen *cpoA*-Mutanten eine erhöhte Transkriptmenge auf und codieren für einen ABC-Transporter. Gene dieses Clusters wurden bereits mit Antibiotikaresistenz in *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht. So wurde ein Beitrag des *vex*-Clusters an der Vancomycintoleranz vermutet (Novak *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2000). Des Weiteren tauchte *spr0525* auf einer Liste von veränderten Genen auf, die im Verdacht stehen an der Linezolid-Resistenz beteiligt zu sein (Feng *et al.*, 2009) und das Gen *spr0526* (*vex3*) wurde als mögliche Resistenzdeterminante einer cefotaximresistenten Labormutante identifiziert (Fani *et al.*, 2013).

Ebenfalls wurde in allen *cpoA*-Mutanten eine erhöhte Transkriptmenge des *ytrA*-Clusters beobachtet. Es setzt sich in *S. pneumoniae* R6 aus drei Genen zusammen (*spr1558*, *spr1559*, *spr1560*). Diese bilden eventuell eine Transkripteinheit und werden durch den, von *spr1558* putativen transkriptionellen Regulator kontrolliert. Innerhalb der Gruppe der Streptokokken wurde dieses Cluster funktionell nicht charakterisiert, ist aber hoch konserviert.

4.1.5.1.1 Das Hitzeschockprotein ClpL

Aus den Transkriptomanalysen ging hervor, dass das Gen *clpL* in allen *cpoA*-Mutanten eine erhöhte Expression im Vergleich zu Parentalstamm R6 aufwies.

Bei ClpL handelt es sich um die ATP-bindende Untereinheit einer ATP-abhängigen Protease. Das Heat Shock Protein gehört der HSP100/Clp (caseinolytic protease) Chaperonfamilie an. Peterson *et al.* konnten ClpL im Zuge von DNA-Microarrayanalysen als Teil des Kompetenzregulons identifizieren (Peterson *et al.*, 2004). 2011 konnten Tran *et al.* zeigen, dass eine Überexpression von ClpL zu einem Resistenzanstieg gegenüber Penicillin, sowie zu einer erhöhten Generationszeit führt.

4. Ergebnisse

Die Tatsache, dass ein verlangsamtes Wachstum, eine verminderte Suszeptibilität gegenüber β -Lactamen, sowie ein verändertes Kompetenzverhalten charakteristisch für die *cpoA*-Mutanten sind, machte ClpL zu einem interessanten Kandidaten für nachfolgende Untersuchungen. Zunächst musste allerdings überprüft werden, ob die, im Zuge der Transkriptionsanalysen detektierte erhöhte Transkriptmenge von *clpL* auch auf Proteinebene beobachtet werden kann. Hierzu wurden Westernblotanalysen mit Anti-ClpL-Antikörpern (Tran *et al.*, 2011) durchgeführt. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

Die Westernblotanalysen zeigten, dass alle *cpoA*-Mutanten die gleiche ClpL-Menge wie der Wildtyp R6 aufwiesen. Eine bis zu 6-fach erhöhte Menge, wie sie in den Transkriptomanalysen vorlag, kann nicht beobachtet werden. Die höhere Laufhöhe der Bande in R6 Δ *cpoA* ist auf einen Riss des SDS-Polyacrylamidgels und nicht auf eine Änderung des Laufverhaltens zurückzuführen.

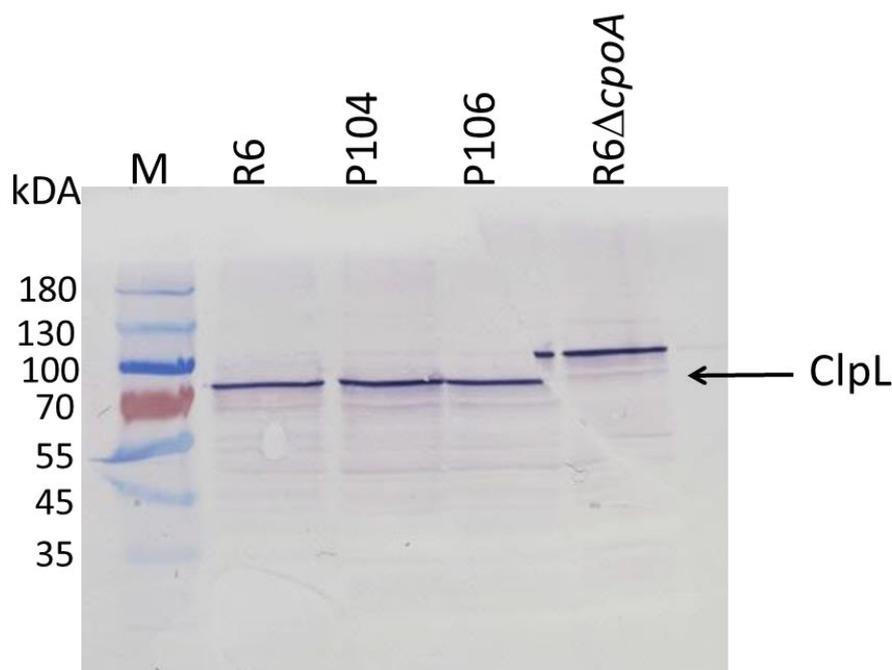


Abbildung 4.16: Westernblot zur Bestimmung der ClpL-Menge

Dargestellt sind die Westernblotanalysen zur Bestimmung der ClpL-Menge im Parentalstamm R6 und den *cpoA*-Mutanten. Die Präparation der Zelllysate erfolgte wie in 3.2.18 beschrieben, die Auftrennung erfolgte über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel. Der primäre Antikörper (Anti-ClpL) wurde in einer Verdünnung von 1:500, der sekundäre Antikörper (Anti-mouse) in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde der peqGold IV Marker (M) aufgetragen. Das berechnete Molekulargewicht von ClpL beträgt 78 kDa.

4.1.5.2 Das Membranprofil der *cpoA*-Mutanten

Wie in Tabelle 4.2 aufgeführt zeigten die *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp R6 ein verändertes Transkriptionsprofil vor allem in Genen, die für Membranproteine wie ABC-Transporter oder PTS-Systeme codieren.

Um einen besseren Blick auf die Membranproteine zu ermöglichen, wurden die cytoplasmatischen und die Membranproteine von R6, sowie den drei *cpoA*-Mutanten mittels Ultrazentrifugation getrennt. Anschließend wurden sie über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Das Ergebnis kann der Abbildung 4.17 entnommen werden.

Es zeigt sich, dass auf dem SDS-Polyacrylamidgel keine quantitativen Unterschiede im Bezug auf die cytoplasmatischen Proteine, wie auch auf die Membranproteine detektiert werden können. Eine signifikante Veränderung der Membranproteinprofile der *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp R6, so wie die Transkriptomanalysen vermuten liesen, kann nicht verzeichnet werden. Bei genauer Betrachtung des Polyacrylamidgels fällt auf, dass die Membranfraktion der *cpoA*-Mutanten schwächer ausfallen, wie die des Parentalstammes R6, während die cytoplasmatischen Fraktionen nahezu identisch erscheinen. Diese Beobachtung konnte durch eine erneute Probenisolierung nicht bestätigt werden.

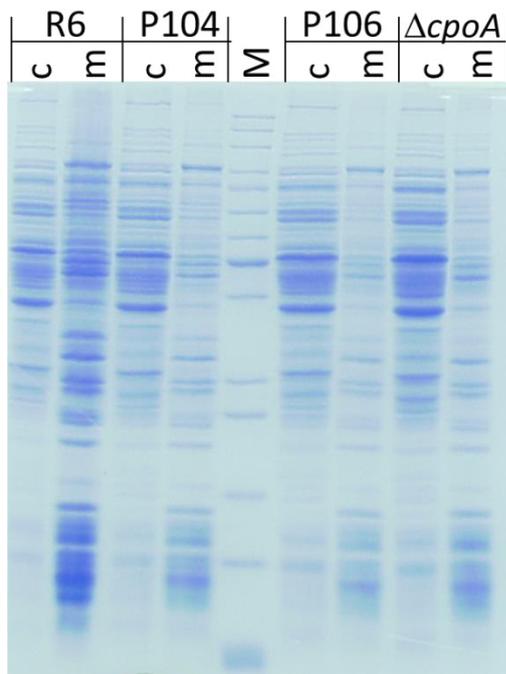


Abbildung 4.17: Cytoplasmatische und Membranproteine des Wildtyps R6 und der *cpoA*-Mutanten
 Dargestellt sind die Coomassie gefärbten cytoplasmatischen und Membranproteine von R6, P104, P106 und R6Δ*cpoA*. Die Auftrennung erfolgte per SDS-Gelelektrophorese über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde der peqGold II Marker (M) aufgetragen. c= cytoplasmatische Proteinfraction; m= Membranproteine

4.2 Analyse β -Lactamresistenter Pneumokokken

Neben der Generierung spontaner Mutanten durch Selektion auf stufenweise erhöhter β -Lactamkonzentration, wie sie im Kapitel 4.1 beschrieben wurde, existiert noch eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Resistenzentwicklung in Pneumokokken, die Transformation mittels chromosomaler DNA.

Hochresistente Pneumokokkenstämme sind oft das Resultat von Gentransfer zwischen sensitiven *S. pneumoniae*-Stämmen und hochresistenten kommensalen Streptokokken-Spezies wie *S. mitis* und *S. oralis* (Chalkley und Koorhof, 1990; Charkley *et al.*, 1991; Potgieter und Chalkley, 1991).

Hakenbeck *et al.* versuchten 1998 einen solchen Gentransfer unter Laborbedingungen nachzustellen. Hierzu transformierten sie den sensitiven *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA des hochresistenten kommensalen *S. mitis* B6. In vier Transformationsschritten mit sukzessiv ansteigender β -Lactamkonzentration konnte das komplette Resistenzniveau von *S. mitis* B6 auf den Rezipienten übertragen werden (Hakenbeck *et al.*, 1998; Sauerbier *et al.*, 2012). Dieser Resistenzanstieg wurde vor allem durch die Übertragung niederaffiner PBPs vermittelt.

Ein weiteres Transformationsexperiment wurde von Todorova (2010) durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob die Resistenzübertragung auch von einem phylogenetisch weiter entfernten Kommensalen auf *S. pneumoniae* möglich ist (Chi *et al.*, 2007). Hierzu wurde *S. pneumoniae* R6 mit chromosomaler DNA des hochresistenten *S. oralis* Uo5 transformiert und auf sukzessiv steigender β -Lactamkonzentration selektioniert. Um möglichst viele niederaffine PBPs aus *S. oralis* zu übertragen, wurden für die Selektion drei unterschiedliche β -Lactamantibiotika verwendet (Piperacillin, Cefotaxim, Oxacillin). In sechs Transformationsschritten mit sukzessiv gesteigerter Antibiotikakonzentration, konnten sechs Transformanten generiert werden. Die Bezeichnung der Stämme erfolgte nach dem Selektionsantibiotikum in der Reihenfolge, in der sie verwendet wurden. Das Resistenzniveau der Transformanten konnte sukzessive in jedem Selektionsschritt gesteigert, die MHK des Donors Uo5 aber nicht erreicht, werden. Abbildung 4.18 gibt einen schematischen Überblick der Transformanten, die im Zuge dieses Transformationsexperimentes generiert wurden.

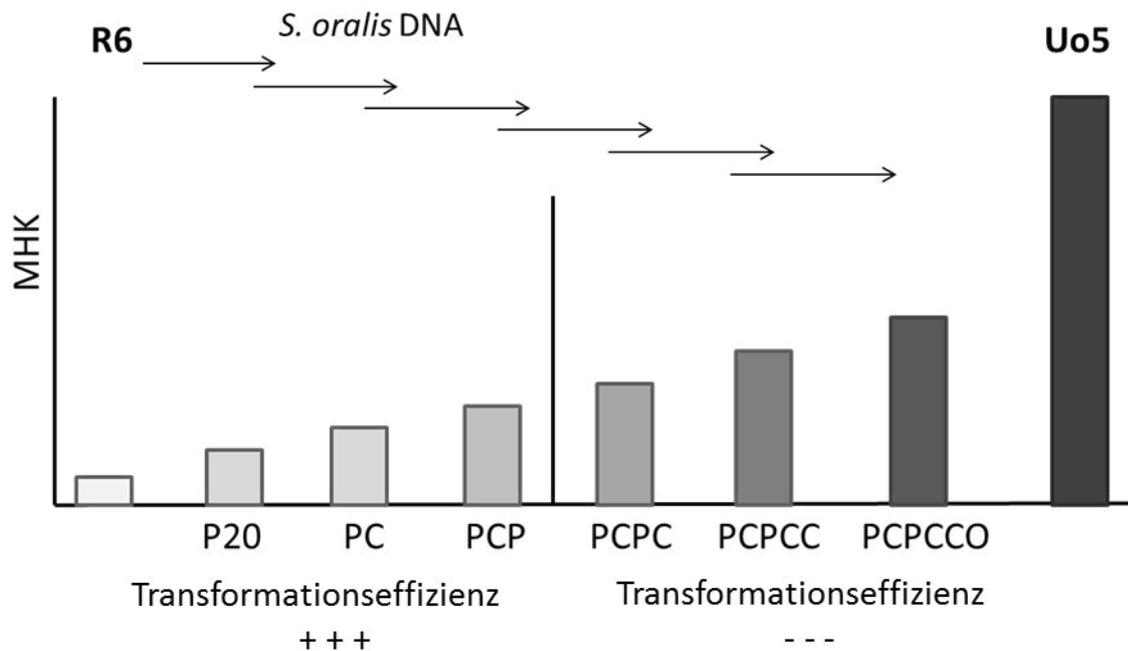


Abbildung 4.18: Mutanten des horizontalen Gentransfers zwischen *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6

Schematische Darstellung der im Zuge des horizontalen Gentransfers zwischen *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 generierte Mutanten. Jeder Pfeil symbolisiert eine Transformationsstufe, bei der der jeweilige Rezipient mit chromosomaler Uo5-DNA transformiert wurde. Die Bezeichnung der Stämme erfolgte in der Reihenfolge der verwendeten Selektionsantibiotika (P: Piperacillin, C: Cefotaxim, O: Oxacillin). +++ symbolisiert die hohe Transformationseffizienz in den ersten drei Selektionsschritten, - - - die relativ geringe Transformationseffizienz der letzten drei Transformationsschritte.

Hinsichtlich der Effizienz, mit der die Transformanten erhalten wurden, können sie in zwei Gruppen unterteilt werden. Während in den ersten drei Selektionsschritten die Effizienz relativ hoch war, konnten in den letzten drei Schritten vergleichbar wenige Transformanten generiert werden.

Durch die Arbeiten von Todorova *et al.* (2015), konnte gezeigt werden, welche Veränderungen den Resistenzanstieg der ersten drei Selektionsschritte bewirkt. Mittels der Methode der Bocillinmarkierung konnten in allen drei Transformanten niederaffine PBPs identifiziert werden. Im ersten Selektionsschritt kam es zur teilweisen Übertragung von PBP2x von *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6, im zweiten Selektionsschritt PBP1a und im dritten Selektionsschritt wurde große Bereiche von PBP2b übertragen.

Durch Mikroarray-Analysen konnten in P20 noch eine weitere Resistenzdeterminante identifiziert werden, die Aminosäureligase MurE. MurE katalysiert in gram-positiven Bakterien die ATP-abhängige Anheftung von L-Lysin an die wachsende Peptidkette innerhalb der Peptidoglykanbiosynthese (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1994). Über ihre Aminogruppe ist L-Lysin an der Bildung der Quervernetzung

zweier Peptidketten beteiligt und nimmt somit eine zentrale Rolle in der Stabilität der Zellwand ein (Strancar *et al.*, 2007).

Durch Transformationsexperimente in denen die niederaffinen PBPs, sowie Uo5-MurE in die entsprechenden Stämme transformiert wurden und durch die anschließenden MHK-Analysen, konnte nachgewiesen werden, dass die identifizierten Resistenzdeterminanten für den Resistenzanstieg in den ersten drei Selektionsschritten verantwortlich sind (Todorova *et al.*, 2015).

Durch Todorava *et al.* (2015) konnte klar gezeigt werden, welche Gene in den ersten drei Selektionsschritten von dem hochresistenten *S. oralis*-Isolat auf den sensitiven *S. pneumoniae* R6 übertragen wurden und den Resistenzanstieg vermitteln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche Gene in den Selektionsstufen vier, fünf und sechs von Uo5 auf R6 übertragen wurden und welche Veränderungen für den Anstieg des Resistenzniveaus verantwortlich sind.

4.2.1 Ermittlung der Resistenzdeterminanten

Die Transformationsreihe, die durch den horizontalen Gentransfer zwischen *S. oralis* und *S. pneumoniae* entstanden ist, besteht aus sechs Transformanten, die auf einer sukzessiv gesteigerten β -Lactamantibiotikakonzentration selektioniert wurden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die MHK, für die drei, zur Selektion verwendeten β -Lactame, erneut bestimmt. Neben den sechs Transformanten, wurden auch die Resistenzen für den Donorstamm Uo5 und den Rezipienten R6 bestimmt.

Die hierbei erzielten Werte können der Tabelle 4.3 entnommen werden.

Tabelle 4.3: MHK für Piperacillin, Cefotaxim und Oxacillin

Mutante	Piperacillin [$\mu\text{g/ml}$]	Cefotaxim [$\mu\text{g/ml}$]	Oxacillin [$\mu\text{g/ml}$]
<i>S. pneumoniae</i> R6	0,03	0,015	0,07
P20	0,1	0,4	1
PC3	0,13	0,9	1,4
PCP	3	1,5	15
PCPC	5	4	24
PCPCC	5,5	7	26
PCPCCO	7	7	34
<i>S. oralis</i> Uo5	50	10	50

Aus den MHK-Analysen geht hervor, dass das Resistenzlevel des Rezipienten R6 mit jedem weiteren Selektionsschritt gesteigert werden konnte. Allerdings konnte bei keinem der drei getesteten Antibiotika das Resistenzniveau des Donorstammes Uo5 erreicht werden. Während die MHK für Cefotaxim bei PCPCCO mit 7 $\mu\text{g/ml}$ noch relativ nahe am Resistenzniveau von Uo5 (10 $\mu\text{g/ml}$) lag, so erreichte PCPCCO nur ein Siebtel der Piperacillinresistenz des Donorstammes. Obwohl das Resistenzniveau von Uo5 bei keinem Selektionsantibiotikum erreicht werden konnte, so konnte die Resistenz des Ausgangstammes R6 enorm gesteigert werden. Für Piperacillin ist ein mehr als 200-facher Anstieg, für Cefotaxim und Oxacillin sogar ein knapp 500-facher Resistenzanstieg zu verzeichnen.

Wie bereits beschrieben, wurden in den ersten drei Selektionsschritten drei resistente PBPs (PBP2x, PBP1a, PBP2b) von Uo5 auf R6 übertragen. Um herauszufinden, ob noch weitere PBPs von Uo5 übertragen wurden, wurden die PBPs der Transformanten, sowie des Ausgangstammes R6 mit dem fluoreszierenden Penicillinderivat Bocillin markiert und mittels SDS-Page aufgetrennt. Erste Hinweise auf das PBP-Profil der letzten drei Transformanten wurden bereits in einer früheren Arbeit (Todorova, 2010) erzielt. Diese deuteten auf keinen weiteren PBP-Austausch nach dem dritten Selektionsschritt hin. Im Zuge dieser Arbeit wurde das PBP-Profil aller sechs Transformanten nochmals überprüft und mit dem des Ausgangstammes R6 verglichen. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

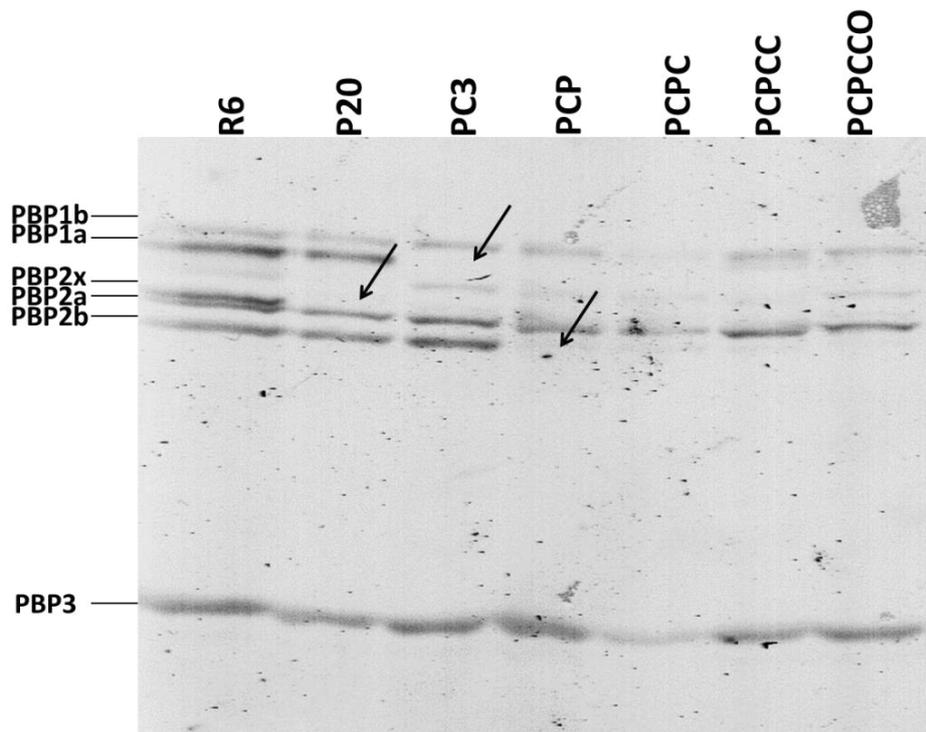


Abbildung 4.19: PBP-Profil des Ausgangsstammes R6 und der Transformanten

Dargestellt ist das PBP-Profil der Transformanten, sowie des Ausgangsstammes R6. Die Zelllysate wurden mittels Bocillin markiert (3.2.16) und auf ein 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung mittels SDS-Page wurden die PBP-Profile mittels Fluorographie bei 488 nm visualisiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen niederaffine PBPs, in dem Selektionsschritt, indem sie zum ersten Mal aufgetreten sind.

Auf dem Bocillingel sind die niederaffinen PBPs der Transformanten P20 (PBP2x), PC3 (PBP1a) und PCP (PBP2b) deutlich zu erkennen. Ab dem vierten Selektionsschritt kann keine Veränderung des PBP-Profiles mehr detektiert werden. Eine weitere Übertragung von *pbp*-Genen in den letzten drei Transformationsschritten kann demnach nahezu ausgeschlossen werden. Um herauszufinden, welche Veränderungen sich in PCPC, PCPCC und PCPCCO ereignet haben und den Resistenzanstieg in den letzten drei Selektionsschritten vermitteln, wurde die Genome der Mutanten PCP und PCPCCO sequenziert.

4.2.1.1 Genomsequenzierung der Mutanten PCP und PCPCCO

Die Sequenzierung der Genome von PCP und PCPCCO erfolgte nach der Illumina paired-end Technologie. Die erhaltenen Sequenzen wurden von Herrn Martin Rieger ausgewertet. Das Zusammenfügen der Reads erfolgte durch den gsAssembler (Newbler) 2.6 (persönliche Mitteilung). Da sowohl das Genom des Rezipienten R6 (Hoskins *et al.*, 2001), wie auch das des Donorstammes Uo5 (Reichmann *et al.*, 2011) vollständig sequenziert sind, konnten die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse von PCP und PCPCCO mit diesen verglichen werden.

Der Vergleich zeigte, dass insgesamt 21 Gene in PCP Uo5-Sequenz aufwiesen. 14 dieser R6-Gene wurden teilweise durch Uo5-DNA und sieben Gene vollständig durch sechs Uo5-Gene ersetzt. Die 21 ausgetauschten Gene sind in neun Clustern organisiert.

In Tabelle 4.4 sind die Gene aufgeführt, die im Zuge des horizontalen Gentransfers von Uo5 auf R6 übertragen wurden.

Tabelle 4.4: Im Zuge des horizontalen Gentransfers ausgetauschte Gene von *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6

Gen-Nr. R6	Gen-Nr. Uo5	Gen	Produkt
spr0147	sor1832	ABC-SBP	putative ABC transporter solute-binding protein - unknown substrate
spr0148	sor1831	dapE	putative Succinyl-diaminopimelic desuccinylase (ArgE/DapE/Acy1 family protein)"
spr0149	sor1830	ABC-NBD	putative ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate
spr0304	sor0341	pbp2x	Penicillin-binding protein 2X
spr0305	spr0342	mraY	Undecaprenyl-phosphate-UDP-MurNac-pentapeptide phospho-MurNac-pentapeptide transferase
spr0328	sor1642	-	Conserved hypothetical protein
spr0329	sor1641	pbp1a	Penicillin-binding protein 1A
spr0330	sor1640	recU	Recombination protein U
spr0755	sor0818	-	Conserved hypothetical protein; Putative lipoprotein precursor
spr0756	sor0819	parE	Topoisomerase IV subunit B
spr0947	sor1925	-	Conserved hypothetical protein
spr1046	sor0993	xerC	putative Integrase/recombinase
spr1383	sor0660	PST transporter	Polysaccharide transporter
spr1384	sor0659	murE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-L-lysine Ligase
spr1385	sor0658	-	Hypothetical protein
spr1386*	sor0657*	-	Hypothetical protein
spr1387*		-	Hypothetical protein
spr1502	sor0586	ileS	isoleucyl-tRNA synthetase
spr1517	sor0561	pbp2b	Penicillin-binding protein 2B
spr1518	sor0560	-	Conserved hypothetical protein; Probable transcriptional regulator
spr1519	-	glk	putative Glucokinase

Teilweise ausgetauschte Gene sind blau, vollständig ausgetauschte Gene gelb hinterlegt.

* Das Gen *sor0657* ersetzt die beiden Gene *spr1386* und *spr1387*

4. Ergebnisse

Die Auswertung der PCPCCO-Genomsequenz offenbarte, dass auch in diesem Stamm die gleichen 21 Gene ausgetauscht wurden. Es konnten keine weitere Uo5-DNA-Sequenz im Vergleich zu PCP identifiziert werden.

Von den insgesamt 2.037.964 bp konnten in PCPCCO 1.977.000 bp, also 97,01 % aller Basenpaare sequenziert werden. 60.964 bp (2,99 %) blieben unbekannt. 96,09 % (1.958.367 bp) der sequenzierten DNA bestand dabei aus R6-, 0,91 % (18.633 bp) aus Uo5-DNA.

Die Sequenzierungsergebnisse zeigen demnach ganz deutlich, dass nach dem dritten Selektionsschritt keine weiteren Resistenzdeterminanten von Uo5 auf R6 übertragen wurden.

Um herauszufinden, was den Resistenzanstieg in den letzten drei Selektionsschritten bewirkt hatte, wurden die Genomsequenzen von PCP und PCPCCO verglichen. Durch diesen Vergleich konnten vier Gene identifiziert werden, die eine unterschiedliche Sequenz in PCPCCO aufwiesen. Um zu klären, ob und wenn ja in welchem Selektionsschritt sich die jeweilige Veränderung ereignet hatte, wurden die potentiell veränderten Sequenzbereiche per PCR amplifiziert und anschließend in den Transformanten PCP, PCPC, PCPCC und PCPCCO sequenziert.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich in den letzten drei Selektionsschritten drei Punktmutationen, sowie eine Deletion ereignet hatten. Die betroffenen Gene, die Mutationen, sowie die daraus resultierenden Aminosäureaustausche können der Tabelle 4.5 entnommen werden.

Tab.4.5: Identifizierte Veränderungen in PCPC, PCPCC und PCPCCO

Mutante	Verändertes Gen	Veränderung (Genomsequenz →Protein)
PCPC	<i>ciaH</i>	c773a → A258E
	<i>spr1992</i>	t815c → I272T
PCPCC	<i>htrA</i>	Δ333-342 → Stopp 125
PCPCCO	<i>pbp2b</i>	a1217c →Q406P

Aufgeführt sind die durch Sequenzierung identifizierten Veränderungen in PCPC, PCPCC und PCPCCO. Neben dem betroffenen Gen sind die Positionen der Punktmutationen (bei PCPCC der Deletion), sowie die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proteinsequenz angegeben.

Wie in Tabelle 4.5 beschrieben, ereigneten sich in PCPC zwei Mutationen. In der Histidinkinase CiaH des Zweikomponentensystems CiaRH führte eine Punktmutation (c773a) zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Glutamat an Position 258. Eine zweite Punktmutation in dem Gen *spr1992* (t815c), das für ein hypothetisches Protein codiert, resultierte in einen

Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin an Position 272. In den beiden letzten Selektionsschritten konnte jeweils nur eine Veränderung identifiziert werden. In PCPC kam es zu einer 10 bp Deletion in der Serinprotease HtrA. Diese Deletion hatte ein Stoppcodon an Position 125, der 397 Aminosäuren langen Protease zur Folge. In PCPCO ereignete sich eine Punktmutation in PBP2b (a1217c). Diese Mutation befindet sich im Uo5-Sequenzbereich, der bereits im dritten Selektionsschritt (PCP) ausgetauscht wurde, und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Prolin an Position 406.

Bevor die Auswirkung dieser Veränderungen und die Charakterisierung von PCPC, PCPC und PCPCO besprochen werden, wird zunächst detailliert auf das neu entdeckte *ciaH*-Allel eingegangen.

4.2.2. Charakterisierung eines neuen *ciaH*-Allels

In PCPC konnte eine Punktmutation in der Histidinkinase *ciaH* des Zweikomponentensystems CiaRH identifiziert werden. Bei *CiaH* handelt es sich um die erste, nicht-PBP-Resistenzdeterminante, die in *S. pneumoniae* beschrieben wurde (Guenzi *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999). Entdeckt wurde sie durch Untersuchungen zur Entstehung der β -Lactamresistenz. Hierbei wurden mehrere unabhängige Familien von β -Lactamresistenten Labormutanten ausgehend von dem β -Lactamsensitiven Stamm *S. pneumoniae* R6 durch sukzessiv erhöhte Antibiotikakonzentration, selektioniert (Laible & Hakenbeck, 1987).

Durch frühere Arbeiten weiß man, dass eine Punktmutation innerhalb des Histidinkinasegens *ciaH* häufig eine starke Aktivierung des Responseregulators CiaR bewirkt (Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b; Müller *et al.*, 2011). Durch die Punktmutationen und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche kommt es zu einer stärkeren Phosphorylierung von CiaR, was eine gesteigerte Aktivität des CiaR-Regulons bewirkt.

In der Arbeit von Müller *et al.* (2011) wurden mehrere *ciaH*-Allele aus spontanen β -Lactamresistenten Labormutanten charakterisiert und ihren Einfluss auf die Aktivität des Zweikomponentensystems untersucht. Die Position dieser Veränderungen, sowie ihre Auswirkung auf die Aktivität des CiaRH-Systems sind in Abbildung 4.20 aufgeführt. Die Position des in PCPC identifizierten neuen *ciaH*-Allels (*ciaH773*) ist ebenfalls markiert. Die Aktivitätsbestimmung des CiaRH-System erfolgte indirekt über die Messung der Expressionsstärke von P_{htrA} , einen stark CiaR-abhängigen Promotor (Halfmann *et al.*, 2007a).

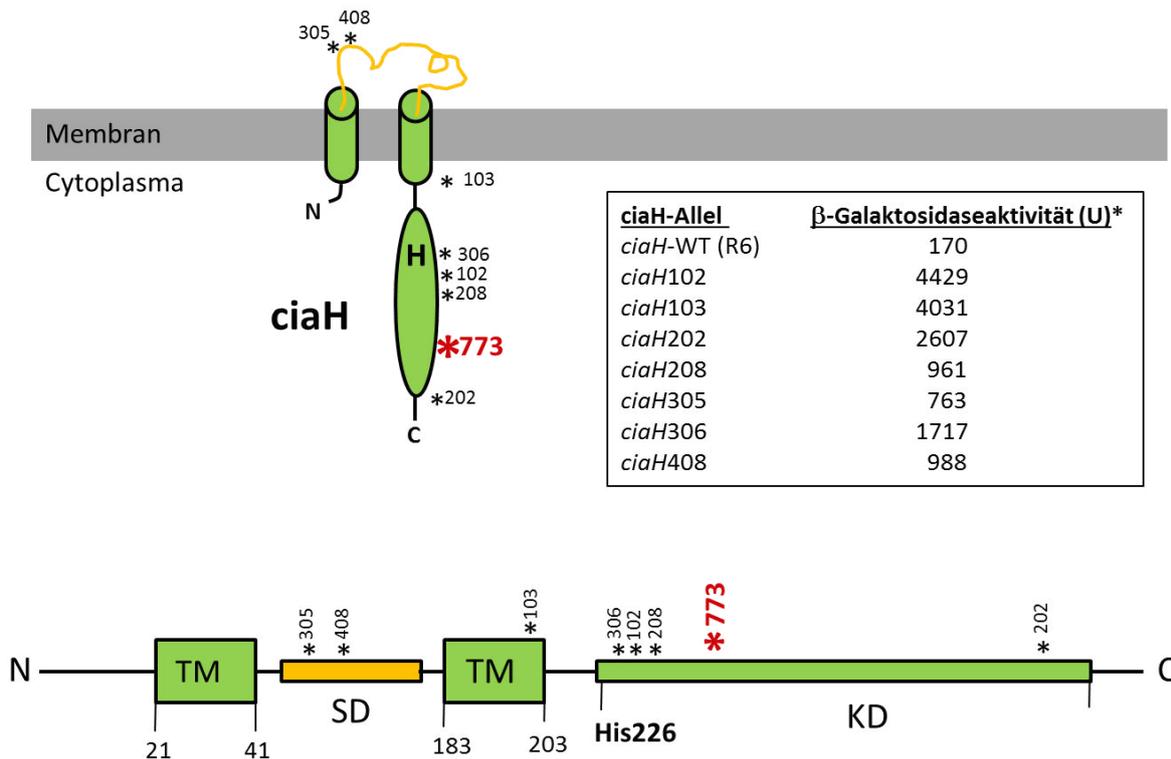


Abbildung 4.20: Lokalisierung des neuen *ciaH*-Allels 773, sowie die Positionen bereits identifizierter *ciaH*-Allele

Dargestellt ist die Histidinkinase CiaH, sowie die Position der bereits identifizierten und durch Müller *et al.* (2011) beschriebenen *ciaH*-Allele. Die Position des, in dieser Arbeit entdeckten, Allels *ciaH*773 ist rot markiert. H kennzeichnet die Position des katalytischen Histidins. Rechts sind die durch Müller *et al.* (2011) bestimmten β-Galaktosidaseaktivitäten für P_{htrA} der einzelnen *ciaH*-Allele der Labormutanten und des Wildtypes (WT) dargestellt. TM: Transmembrandomäne, SD: Sensordomäne, KD: Kinasedomäne

* Units (U) sind definiert als nmol freigesetztes ONPG/ min/ mg Protein.

Wie in Abbildung 4.20 zu erkennen, befindet sich das Allel *ciaH*773 innerhalb der Kinasedomäne von CiaH, zwischen den beiden Allelen *ciaH*208 und *ciaH*202, die bereits durch Müller *et al.* (2011) charakterisiert wurden. *ciaH*208 bewirkt einen knapp 6-fachen, *ciaH*202 einen 15-fachen Anstieg der CiaR Aktivität. Insgesamt konnte für alle Punktmutationen in der Kinasedomäne, sowie innerhalb der Sensordomäne und *ciaH*103 eine Steigerung der CiaR-vermittelten Promotoraktivität beobachtet werden (Müller *et al.*, 2011).

Ob auch *ciaH*773 eine Hyperaktivität des Zweikomponentensystems vermittelt, sollte durch anschließende Untersuchungen herausgefunden werden. Hierzu sollte die in PCPC identifizierte *ciaH*-Punktmutation in den Wildtyp R6 eingeführt werden. Wie bereits bei Müller *et al.* (2011) beschrieben, wurde hierzu eine Janus-Kassette verwendet.

4. Ergebnisse

Alle Versuche das *ciaH773*-Allel mittels der Januskonstruktion in R6 einzubringen scheiterten. Zum einen, war die Transformationseffizienz sehr gering und zum anderen konnten keine R6*ciaH773*-Mutanten ohne Zusatzmutationen selektioniert werden. Durch frühere Arbeiten (Müller, 2011; Laux, 2014) war bereits bekannt, dass starke *ciaH*-Allele oft zur Instabilität neigen. Es treten vermehrt Zusatzmutationen auf, die die Hyperaktivität des Zweikomponentensystems mindern. Die Probleme bei der Konstruktion von R6*ciaH773* deuteten darauf hin, dass es ebenfalls zu den stärkeren *ciaH*-Allelen gehört.

Um mehr über die Stärke des neuen Alles zu erfahren, wurde seine Auswirkungen auf die Aktivität von CiaRH in den Stämmen PCPC, PCPCC und PCPCCO untersucht. Die Bestimmung der Aktivität des CiaRH Systems fand dabei indirekt über die Aktivität des Responseregulators CiaR statt. Hierzu wurde die Promotoraktivität eines stark von CiaR abhängigen Promotors P_{htrA} bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007a). Dieser Promotor wurde als Promotor-*lacZ*-Fusion über das Plasmid pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae* integriert und die Promotoraktivität über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007b).

Die Messungen bestätigten die Vermutung, dass *ciaH773* zu den starken, instabilen Allelen gehört. Vermehrt traten Mutationen auf, die die Hyperaktivität des CiaRH-Systems reduzierten. Die Bestimmung eines Wertes war aufgrund der starken Schwankungen und der daraus resultierenden, enormen Standardabweichung nicht möglich. Eine exemplarische Darstellung kann der Abbildung 4.21 entnommen werden.

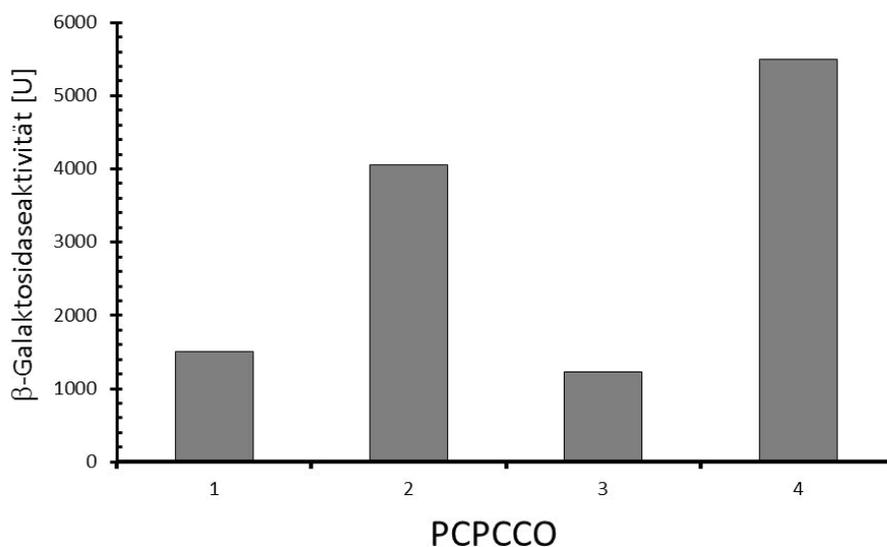


Abbildung 4.21: Durch P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität der Mutante PCPCCO

Gezeigt sind die Ergebnisse der Bestimmung der durch P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von PCPCCOpPP2_{*htrA*}. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

4. Ergebnisse

Um dennoch mit den Stämmen PCPC, PCPCC und PCPCCO arbeiten zu können und mehr über das *ciaH773*-Allel zu erfahren, wurde die Expression von *ciaH773* unter die Kontrolle eines Tetracyclin induzierbaren Promotors gestellt.

4.2.2.1. Das *ciaH773*-Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin induzierten Promotors

Um das Risiko von sekundären Mutationen zu umgehen, die die Hyperaktivität herabsetzen, wurde das *ciaH773*-Allel unter die Kontrolle eines Tetracyclin induzierbaren Promotors gestellt. Dies ermöglicht es, die Stämme während der Konstruktion in einem uninduzierten Zustand, vergleichbar mit Δ *ciaH*, zu halten und erst unmittelbar vor der Messung zu induzieren. Die Deletion von *ciaH* erfolgte mittels einer Spectinomycinkassette. Da *ciaR* und *ciaH* in einem Operon liegen, wurde die Spectinomycinkassette innerhalb von *ciaH* integriert, um negative Effekte auf *ciaR* zu vermeiden. Auch bei der Konstruktion von pTEX*ciaH773* wurde die Operonstruktur berücksichtigt. Das *ciaH773*-Allel wurde zusammen mit einem *ciaR*-Minigen kloniert, um eine mögliche translationelle Kopplung von CiaR und CiaH zu erhalten. Da große Teile von *ciaR* deletiert sind, ist es nicht mehr aktiv. Die genaue Konstruktion von pTEX*ciaH773* kann dem Kapitel 3.2.23 entnommen werden. Die genetische Organisation im Genom ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

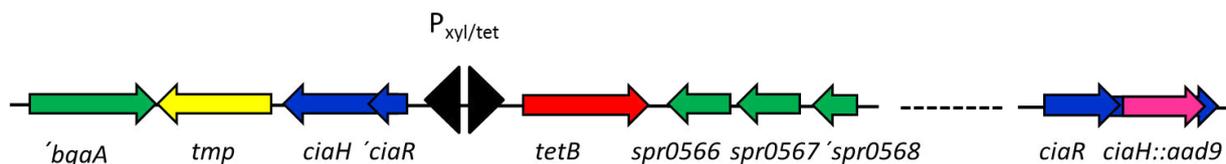


Abbildung 4.22: Genetische Organisation von pTEX*ciaH773*

Dargestellt ist die genetische Organisation der Region zwischen *'bgaA* und *'spr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pTEX*ciaH773*, sowie die Inaktivierung von *ciaH* mittels Spectinomycinkassette. Die Pfeile kennzeichnen die Position der einzelnen Gene. *'bgaA*: Teil des β -Galaktosidasegens, *tmp*: Trimethoprim Resistenz, *spr0566-0568*: Funktion unbekannt, *ciaR*: Response Regulator, *ciaH*: Histidinkinase, *add9*: Spectinomycinresistenzgen.

In Zuge früherer Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Promotor $P_{xyl/tet}$ auf die Zugabe von Tetracyclin ebenso stark reagiert wie auf Anhydrotetracyclin. Die maximale Aktivität wurde bereits bei einer Konzentration von 50 ng/ml erreicht. Ohne Zugabe von Tetracyclin bzw. Anhydrotetracyclin war nahezu keine Aktivität messbar. Eine physiologische Beeinträchtigung der Zellen durch die Antibiotikazugabe konnte nicht beobachtet werden (Wandra, 2010; George, 2012).

Neben dem zuvor beschriebenen pTEX*ciaH773*, bei dem der Promotor $P_{xyl/tet}$ upstream des *ciaH773*-Allels kloniert wurde, wurde noch ein zweites Plasmid konstruiert. Statt des *ciaH773*-Allels wurde

4. Ergebnisse

hier die Expression des Wildtyps-*ciaH* unter die Kontrolle des Tetracyclin induzierbaren Promotors gestellt (pTEX*ciaHR6*).

Die beiden Plasmide wurden jeweils in ein *S. pneumoniae* R6 Derivat transformiert, in welchen das native *ciaH*-Gen bereits mittels einer Spectinomycinkassette deletiert worden war. Die Bestimmung der Aktivität des CiaRH Systems fand indirekt über die Aktivität des Responseregulators CiaR statt. Hierzu wurde die Promotoraktivität eines stark von CiaR abhängigen Promotors P_{htrA} bestimmt. Dieser Promotor wurde als Promotor-*lacZ*-Fusion über das Plasmid pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae* integriert und die Promotoraktivität über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Transformation von pPP2_{*htrA*} wurde bereits vor der Integration der pTEX-Plasmide durchgeführt, da pPP2_{*htrA*} mittels einer Tetracyclinkonzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ selektiert wird. Wie zuvor beschrieben, zeigt $P_{xyI/tet}$ schon bei einem Bruchteil dieser Konzentration (50 ng/ml) maximale Aktivität. Somit sollte verhindert werden, dass es während der Konstruktion der Stämme zu Mutationen kommt, die die Hyperaktivität des CiaRH-Systems mindern. Der erste Stamm, der auf diese Weise hergestellt wurde war R6 Δ *ciaH*pPP2_{*htrA*}pTEX*ciaH773*. Um zu ermitteln, welche Anhydrotetracyclinkonzentrationen für die Induktion notwendig ist, wurden unterschiedliche Konzentrationen (5-150 ng/ml) noch vor Beginn des Wachstums dem C+Y-Medium (pH 7,8) zugegeben, die Kulturen angeimpft, bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ inkubiert und anschließend die Messung des β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messung kann der Abbildung 4.23 entnommen werden.

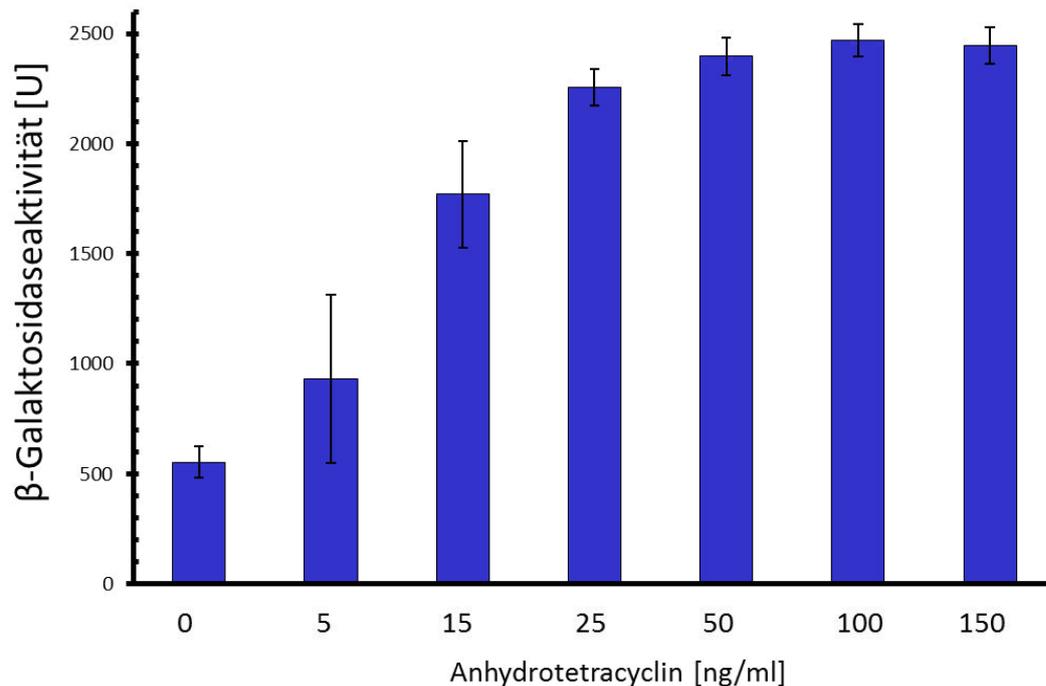


Abbildung 4.23: Durch P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von $R6\Delta ciaHppP2_{htrA}pTEXciaH773$ in Anwesenheit unterschiedlicher Anhydrotetracyclinkonzentrationen

Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die schwarzen Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. Die Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Es zeigt sich, dass bereits bei einer Konzentration von 5 ng eine gesteigerte Aktivität des Promotors P_{htrA} gemessen werden kann. Die vollständige Aktivität wird bei einer Zugabe von 50-100 ng/ml erreicht. Eine unerwünschte Beeinflussung des $htrA$ -Promotors durch das Antibiotikum, konnte durch frühere Arbeiten (Laux, 2014) ausgeschlossen werden.

Es zeigt sich, dass das Tetracyclin induzierbare System zur kontrollierten Expression des $ciaH773$ -Allels verwendet werden kann. Aufgrund der in diesem Versuchsteil erzielten Ergebnisse wurde bei allen nachfolgenden Versuchen eine Anhydrotetracyclinkonzentration von 100 ng/ml zur Induktion verwendet.

4.2.2.2 Charakterisierung des *ciaH773*-Allels

Wie bereits erwähnt wurde in der Transformante PCPC ein neues Allel *ciaH773* entdeckt. Aufgrund der Instabilität, die dieses Allel vermittelt, wurde seine Expression unter die Kontrolle eines Tetracyclin induzierbaren Promotors ($P_{xyl/tet}$) gestellt. Anschließend wurde seine Auswirkung auf die Aktivierung des CiaRH-Systems untersucht. Zum Vergleich wurde der Stamm $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$ mitgeführt, bei dem das Wildtyp-*ciaH* unter der Kontrolle eines Tetracyclin induzierten Promotors steht. Die im Zuge des β -Galaktosidaseassays erzielten Ergebnisse können der Abbildung 4.24 entnommen werden.

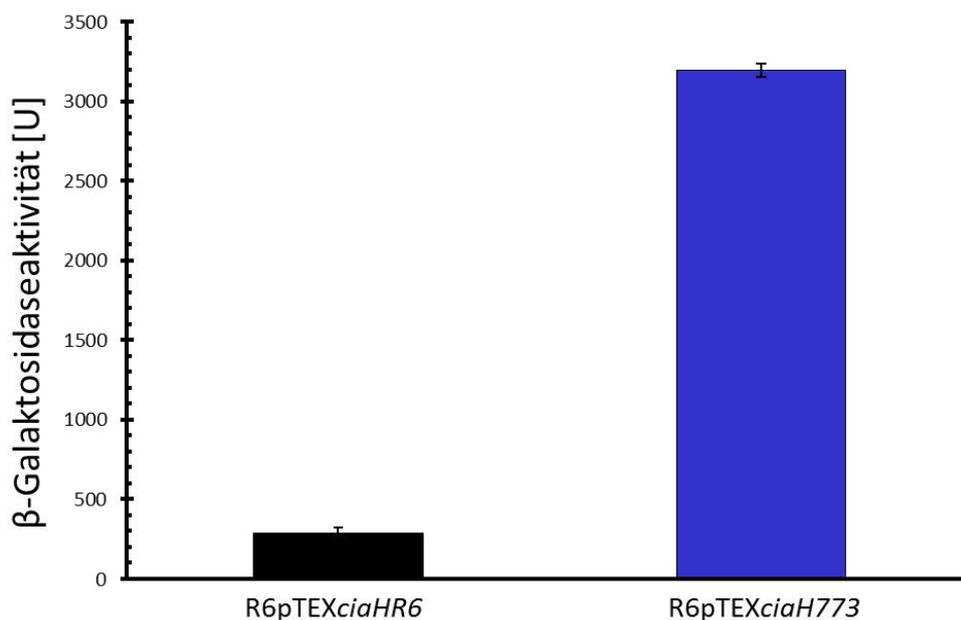


Abbildung 4.24: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit des *ciaH*-Allels

Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die, durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$, die blaue, die von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Es zeigt sich, dass das *ciaH773*-Allel einen ca. 11-fachen Anstieg der CiaR-Aktivität im Vergleich zum WT-Allel bewirkt. Somit zählt es ebenfalls zu den *ciaH*-Allelen, die eine Hyperaktivität des Zweikomponentensystems bewirken. Bezüglich der Aktivierungsstärke des CiaRH-System verhält es sich ähnlich wie andere, innerhalb der Kinasedomäne befindlichen *ciaH*-Allele. So vermittelt *ciaH306*

einen zehnfachen, *ciaH208* einen sechsfachen und *ciaH202* einen 15-fachen Anstieg der CiaR-vermittelt Genaktivität (Müller *et al.*, 2011).

Das CiaRH-System hat Einfluss auf eine Reihe von Phänotypen, zu denen unter anderem die Resistenz gegen β -Laktamantibiotika (Hakenbeck *et al.*, 1999, Giammarinaro *et al.*, 1999), sowie die Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994, Zähler *et al.*, 2002) zählen.

Um zu erfahren, welche phänotypischen Konsequenzen durch die, von *ciaH773* vermittelte Hyperaktivität entstehen, wurde der Einfluss auf β -Laktamresistenz und Kompetenz untersucht.

4.2.2.2.1 Einfluss des *ciaH773*-Allels auf die β -Laktamresistenz

Das in dieser Arbeit identifizierte *ciaH773*-Allel ist während der Selektion auf dem β -Laktamantibiotikum Cefotaxim entstanden. Dies alleine beweist jedoch noch nicht, dass *ciaH773* einen Einfluss auf die β -Laktamresistenz hat. Ob, und wenn ja in welchem Maße dieses *ciaH*-Allel als Resistenzdeterminante fungiert, musste zunächst mittels Tropfentest ermittelt werden. Neben dem zur Selektion verwendeten Cefotaxim, wurde auch die Resistenz gegenüber einem weiterem β -Laktamantibiotikum, Oxacillin, bestimmt.

Neben $R6\Delta\textit{ciaHpPP2}_{\textit{htrA}}\textit{pTEXciaH773}$ wurden als Referenz der Wildtyp R6 sowie $R6\Delta\textit{ciaHpPP2}_{\textit{htrA}}\textit{pTEXciaHR6}$, bei dem das Wildtyp *ciaH* unter die Kontrolle des Tetracyclin induzierten Promotors gestellt wurde, und somit dem R6 Wildtyp entspricht, mitgeführt. Da sich in diesen Stämmen die Expression des *ciaH*-Allels unter der Kontrolle des Tetracyclin induzierbaren Promotors befindet, musste neben dem Flüssigmedium auch dem Festmedium Anhydrotetracyclin zugesetzt werden. Durch die im Rahmen eines Forschungspraktikums durchgeführten Untersuchungen zur Aktivierung des Tetracyclin induzierten Promotors auf Festmedium (Sexauer, 2014), wurde der D-Blutagar mit einer Anhydrotetracyclinkonzentration von 500 ng/ml versetzt.

Wie in Abbildung 4.25 deutlich zu erkennen, vermittelt das *ciaH773*-Allel eine Erhöhung der Cefotaximresistenz. Während beim Wildtyp R6, sowie bei $R6\Delta\textit{ciaHpPP2}_{\textit{htrA}}\textit{pTEXciaHR6}$, bei einer Cefotaximkonzentration von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ kein Wachstum mehr feststellbar ist, verdoppelt sich die Resistenz gegen Cefotaxim durch Einbringen von *ciaH773* auf 0,035 $\mu\text{g/ml}$. Der gleiche Resistenzanstieg ist gegenüber Oxacillin zu verzeichnen. Das *ciaH773*-Allel vermittelt eine Resistenzhöhung von 0,06 auf 0,14 $\mu\text{g/ml}$. Aufgrund des identischen Effektes von *ciaH773* bezüglich der beiden β -Laktamantibiotika, wurde in den nachfolgenden MHK-Untersuchungen auf Oxacillin verzichtet.

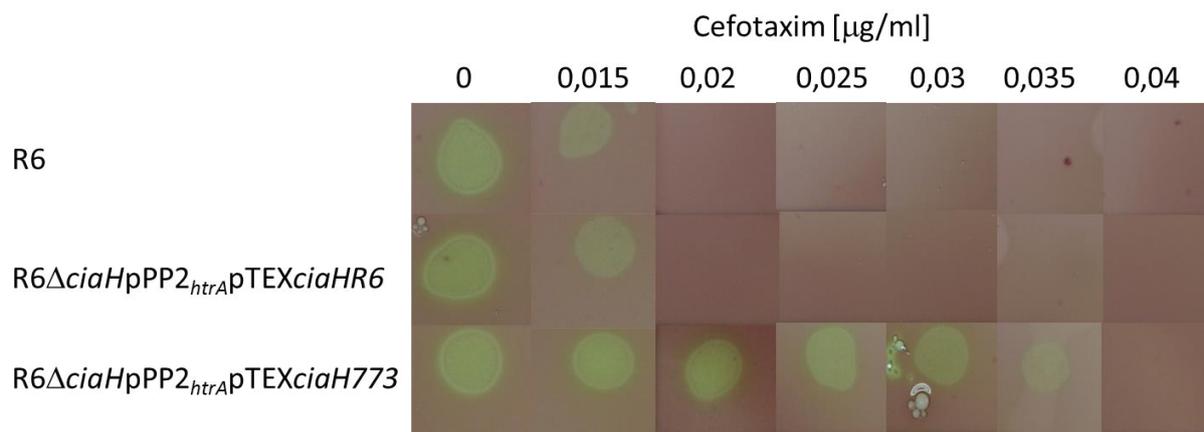


Abbildung 4.25: Auswirkung des *ciaH773*-Alles auf die Cefotaximresistenz

Gezeigt sind die Ergebnisse des Tropfentests zur Bestimmung der MHK für Cefotaxim für die Stämme *S. pneumoniae* R6, R6 Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaHR6* und R6 Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaH773*. Die Inkubation der Stämme fand im C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer OD₆₀₀= 0,3 statt. Zur Inkubation im Flüssigmedium wurde eine Anhydrotetracyclinkonzentration von 100 ng/ml, zur Inkubation auf Festmedium eine Konzentration von 500 ng/ml verwendet.

4.2.2.2 Einfluss des *ciaH773*-Allels auf die Kompetenz

Bei der Entstehung von hochresistenten *S. pneumoniae* Stämmen spielt die Kompetenz eine entscheidende Rolle. Durch die Aufnahme von DNA aus der Umgebung können Resistenzdeterminanten mittels horizontalen Gentransfers verbreitet werden (Dowson *et al.*, 1989; Claverys *et al.*, 2000). Weiterhin übt die Kompetenz auch einen direkten Einfluss auf die Virulenz der Bakterien aus (Bartilson *et al.*, 2001; Lau *et al.*; 2001, Guiral *et al.*; 2005, Kowalko und Sebert, 2008).

Erste Hinweise darauf, dass Punktmutationen in *ciaH* Einfluss auf die Transformierbarkeit haben, wurden bereits durch Guenzi *et al.*, 1994 geliefert. Sie beobachteten, dass es in Transformantenfamilien, in denen sich Mutationen in *ciaH* ereignet hatten, zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit kam. Müller *et al.* (2011) nahmen einen detaillierten Blick auf die Auswirkungen verschiedener *ciaH*-Allele auf die Kompetenz. Sie konnten bei allen getesteten *ciaH*-Allelen einen Rückgang der natürlichen Transformierbarkeit beobachten (Müller *et al.*, 2011).

In Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des *ciaH773*-Allels auf die Kompetenz untersucht. Neben der Durchführung von Transformationstest, wie bei der Untersuchung des Kompetenzverhalten der *cpoA*-Mutanten (4.1.2.2.5) verwendet, kann der Kompetenzphänotyp auch durch Messung der Kompetenzgenexpression ermittelt werden (Laux *et al.*, 2015). Auf diese Methodik hier zurückgegriffen. Hierzu wurden die Expressionen von zwei Genen des

4. Ergebnisse

Kompetenzregulons in Anhängigkeit des *ciaH*-Allels ermittelt. Die Wahl fiel auf ein frühes Kompetenzgen, welches für den alternativen Sigmafaktor ComX codiert, sowie auf ein spätes Kompetenzgen, *cib*. Um die Aktivität dieser Promotoren bestimmen zu können, wurden sie als Promotor-*lacZ*-Fusionen über das Plasmid pPP2 in das Genom von $R6\Delta ciaHpTEXciaHR6$ und $R6\Delta ciaHpTEXciaH773$ integriert und die Menge an exprimierter β -Galaktosidase gemessen. Die hierbei erzielten Ergebnisse können der Abbildung 4.26 entnommen werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass das *ciaH773* einen stark inhibierenden Einfluss auf die Kompetenz ausübt. Während mit dem Wildtyp *ciaH*-Allel die Expression beider Kompetenzgene mit 114 bzw. 314 Units in einem gut exprimierten Zustand vorlagen, sank die Promotoraktivität beider Kompetenzgene in Anwesenheit des *ciaH773*-Allels auf nahezu null Units ab (Abbildung 4.26).

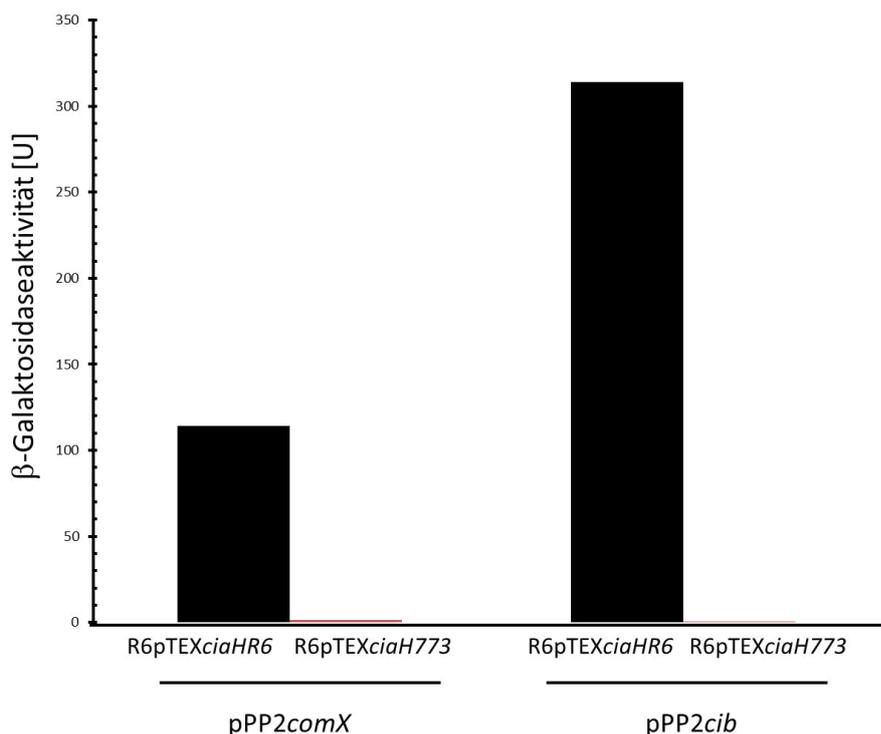


Abbildung 4.26: Aktivität der Promotoren pPP2*comX* und pPP2*cib* in Abhängigkeit des *ciaH*-Allels

Gezeigt ist die Promotoraktivität der beiden Kompetenzgene *comX* und *cib* in Abhängigkeit des *ciaH*-Allels. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarzen Säulen zeigen die durch den Promotor P_{comX} bzw. P_{cib} vermittelte β -Galactosidaseaktivität von $R6\Delta ciaHpTEXciaHR6$, die orangenen Säulen, die von $R6\Delta ciaHpTEXciaH773$. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

4.2.3 Die Mutanten PCPC und PCPCC

Es konnte gezeigt werden, welchen Einfluss *ciaH773* im Wildtyp-Background hat. Allerdings ereignete sich die Mutation *ciaH773* nicht in R6, sondern in der Mutante PCPC. Die Sequenzierungsergebnisse (Tabelle 4.4) offenbarten, dass PCPC 21 Gene enthält, die vollständig bzw. teilweise durch Uo5-DNA ersetzt wurden. Darunter die Penicillin-bindenden Proteine PBP2x, PBP1a und PBP2b, sowie MurE. Daher stellt sich die Frage, welchen Einfluss das *ciaH773*-Allel in seinem natürlichen genetischen Hintergrund ausübt.

Hierzu wurde in der Mutante PCPC das im Genom enthaltene *ciaH* mittels einer Spectinomycinkassette deletiert und das Plasmid pTEX*ciaH773* integriert. Die Bestimmung der Aktivität des CiaRH-Systems erfolgte wie bereits beschrieben indirekt über die Messung der Aktivität des Responseregulators CiaR. Hierzu wurde die Aktivität des stark CiaR-abhängigen Promotors P_{htrA} gemessen. Dieser wurde als Promotor-*lacZ*-Fusion über das Plasmid pPP2 in das Genom integriert. Um Selektionsdruck zu vermeiden, wurde diese Transformation, wie bereits in 4.2.2.1 erwähnt, vor der Integration des pTEX-Plasmides durchgeführt. Anschließend wurden die β -Galaktosidaseaktivitäten bestimmt. Die hierbei erzielten Ergebnisse können der Abbildung 4.27 entnommen werden.

Es zeigt sich, dass *ciaH773* auch in seinem ursprünglichen genetischen Hintergrund zu einer Aktivitätssteigerung des CiaRH-Systems führt. Der Stamm PCPC Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaH773* weist eine 12-fach erhöhte Aktivität des CiaRH-Systems im Vergleich zum Parentalstamm R6 Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaHR6* auf.

Im weiteren Verlauf der Transformationsreihe ereignete sich in der Mutante PCPCC eine 10 bp Deletion in der Serinprotease HtrA. Der daraus resultierende Frameshift hatte ein Stoppcodon an Position 125, der 397 Aminosäuren langen Protease zur Folge und resultierte somit in der Produktion eines Nonsense-Proteins. Aufgrund der Lage der Deletion, im ersten Drittel der Proteasedomäne von HtrA, kommt dies einem Knockout der Serinprotease gleich. Es wurde anschließend untersucht, wie sich das Fehlen von HtrA auf die Aktivität eines bereits stark aktivierten CiaRH-Systems auswirkt. Die Konstruktion des Stammes PCPCC Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaH773* erfolgte entsprechend der bereits beschriebenen Konstruktion von PCPC Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaH773*.

Die Messungen der β -Galaktosidaseaktivitäten (Abbildung 4.27) offenbarten, dass sich in PCPCC die CiaR- vermittelte Genaktivität nochmal erhöht. Die Promotoraktivität von P_{htrA} stieg um das 1,3-fache, im Vergleich zum Vorgängerstamm (PCPC Δ *ciaHpPP2*_{htrA}pTEX*ciaH773*) an.

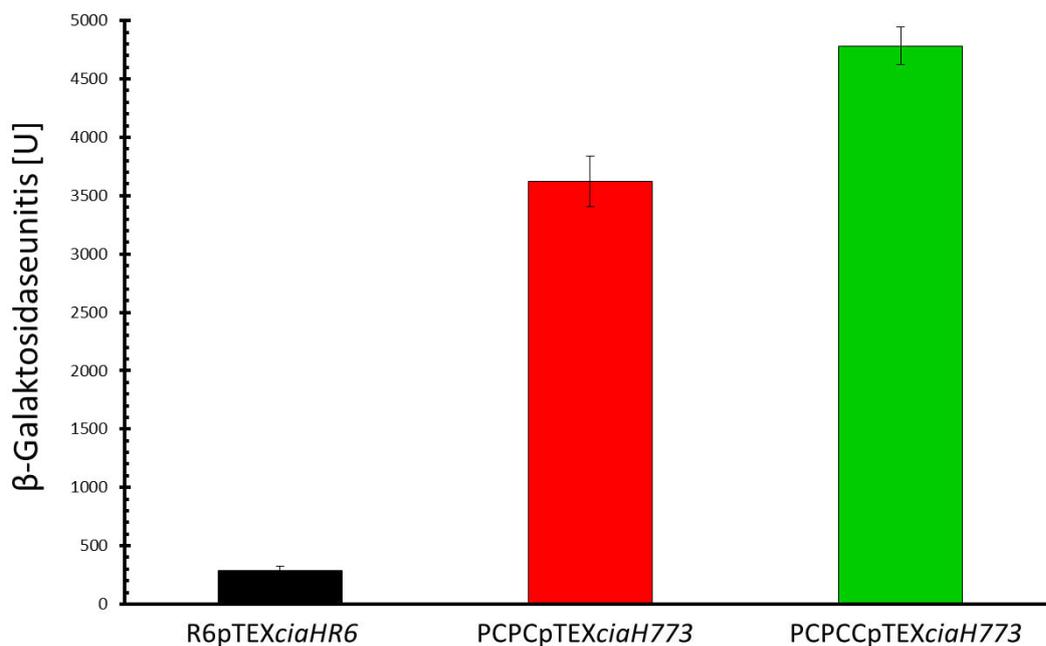


Abbildung 4.27: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von **R6 Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaHR6**, **PCPC Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaH773** und **PCPCcpTEXciaH773** und **PCPC Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaH773**. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von R6 Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaHR6, die rote Säule, die von PCPC Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaH773, die grüne Säule die des Stammes PCPCcpTEXciaH773. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Hyperaktivität der Stämme PCPC und PCPC auf die mit dem CiaRH-System in Verbindung stehenden Phänotypen, Resistenz und Kompetenz eingehend betrachtet.

Für den Resistenztest wurde erneut das β -Lactamantibiotikum Cefotaxim ausgewählt. Zum einen, weil die beiden hier im Fokus stehenden Stämme mittels dieses Antibiotikums selektioniert wurden und zum anderen, da bereits in vorangegangenen Versuchen mit dem *ciaH773*-Allel im Wildtyp-Hintergrund (Kap. 4.2.2.2.1) deutliche Effekte zu erkennen waren. Die Bestimmung der MHK erfolgte erneut mittels Tropfentest, die erhaltenden Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem Vorgängerstamm (PCP) von PCPC Δ ciaHppP2_{htrA}pTEXciaH773 und PCPCcpTEXciaH773, um die Originaltransformante ohne pTEX-Modifizierung handelt, wurden auch die beiden Originaltransformanten PCPC und PCPC bei der MHK-Testung mitgeführt. Somit sollte sichergestellt werden, dass die hier erzielten Ergebnisse nur auf die CiaH und HtrA-Veränderungen zurückzuführen sind.

4. Ergebnisse

Die MHK-Untersuchung zeigte, dass der Stamm *PCPCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* eine doppelt so hohe Resistenz gegenüber Cefotaxim im Vergleich zur Vorgängermutante PCP aufweist. Das Resistenzniveau stieg von 1,5 auf 4 µg/ml. Eine weitere Erhöhung des Resistenzlevels ist im fünften Selektionsschritt zu beobachten. Die Deletion in HtrA bewirkt eine Erhöhung der Resistenz um das 1,7-fache. Unterschiede bezüglich der Original- und pTEX-modifizierten Stämmen konnten nicht beobachtet werden.

Tabelle 4.6: Einfluss der Veränderungen des vierten und fünften Selektionsschrittes auf die Cefotaximresistenz

Mutante	MHK Cefotaxim [µg/ml]
R6	0,015
PCP	1,5
<i>PCPCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773</i>	4
<i>PCPCCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773</i>	7
PCPC	4
PCPCC	7

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentests. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ durchgeführt. Die Anhydrotetracyclinkonzentration im Flüssigmedium betrug 100 ng/ml, in D-Blutagar 500 ng/ml. Die beiden als Kontrollen mitgeführten Stämme PCPC und PCPCC sind grau unterlegt.

Anschließend wurde die Transformierbarkeit von *PCPCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* und *PCPCCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* untersucht. Hierzu wurden wie in 4.2.2.2 beschrieben, die Aktivität von P_{comX} und P_{cib} , zwei Genen des Kompetenzregulons, mittels β -Galaktosidaseassays bestimmt und mit denen des Parentalstammes *R6ΔciaHpTEXciaHR6* verglichen. Die hierbei erzielten Ergebnisse können der Abbildung 4.28 entnommen werden.

Es zeigt sich, dass die Promotoren P_{comX} und P_{cib} eine nahezu kompletten Aktivitätsverlust in *PCPCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* und *PCPCCΔciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* aufweisen. Unterschiede zwischen den beiden Stämmen, konnten aufgrund der sehr niedrigen Aktivität nicht identifiziert werden.

4. Ergebnisse

Dieser komplette Verlust der natürlichen Transformierbarkeit durch *ciaH773* konnte durch einen mit der Transformante PCPC durchgeführten Transformationstest (4.29) untermauert werden. Eine Transformierbarkeit dieses Stammes war nahezu nicht mehr möglich.

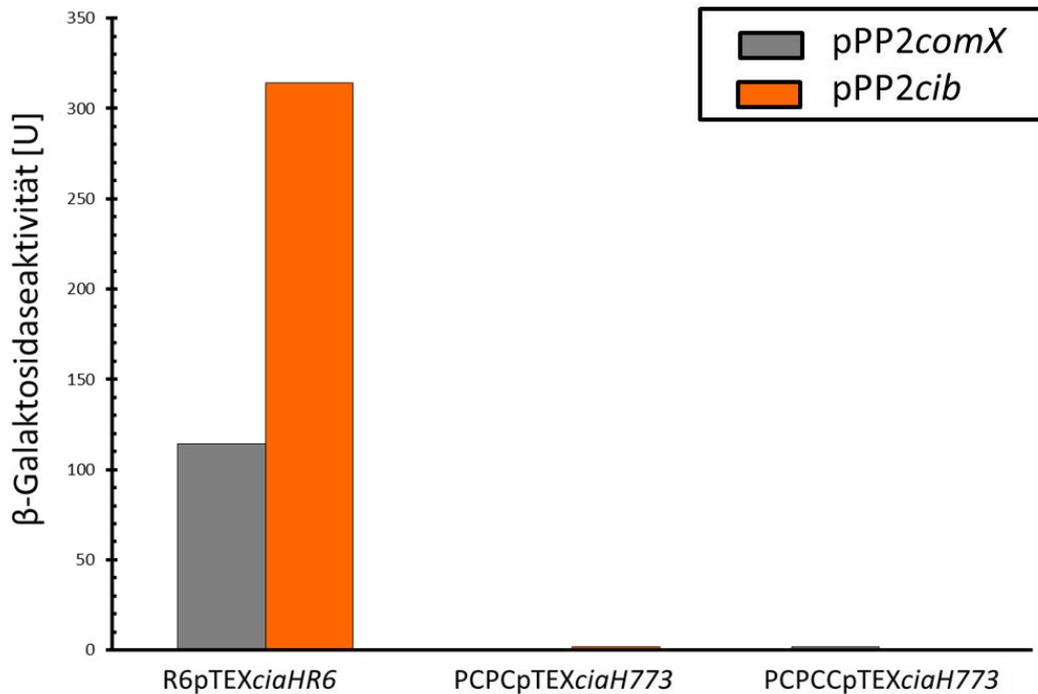


Abbildung 4.28: Aktivität der Promotoren P_{comX} und P_{cib} in Abhängigkeit des *ciaH*-Allels

Gezeigt ist die Promotoraktivität zweier Promotoren des Kompetenzregulons in den Stämmen R6 Δ *ciaHpTEXciaHR6*, PCPC Δ *ciaHpTEXciaH773* und PCPCC Δ *ciaHpTEXciaH773*. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die grauen Säulen demonstrieren die durch den Promotor P_{comX} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten, die orangenen die durch P_{cib} . Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

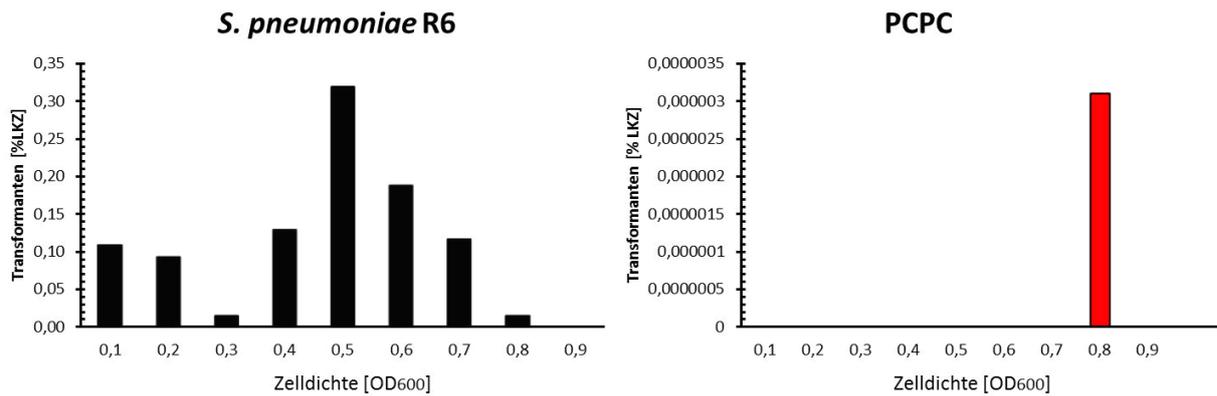


Abbildung 4.29: Tranformationseffizienz von PCPC im Vergleich zum WT R6

Dargestellt sind die Transformationseffizienzen von R6 und PCPC als prozentualer Anteil der Lebendkeimzahl [%LKZ] in Abhängigkeit der Zelldichte [OD₆₀₀]. Die Transformationseffizienz wurde mit Hilfe des Transformationsmarkers *rpsL41*, der Streptomycinresistenz vermittelt, bestimmt. Die Anzucht der Stämme erfolgte im C+Y-Medium (pH 7,8). ■ R6, ■ PCPC

4.2.3.1 Nachstellen der Veränderungen in PCPC und PCPCC

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die *ciaH*-Mutation in PCPC und die Deletion der Serinprotease HtrA in PCPCC eine deutliche Erhöhung der CiaR-Aktivität bewirken. Wie bereits in 4.2.1.1 erwähnt, konnten 97,01% des Genoms von PCPCCO sequenziert werden, es blieben Lücken von insgesamt 60.964 bp. Theoretisch ist es möglich, dass sich innerhalb dieser nicht sequenzierten Bereiche ebenfalls Punktmutationen befinden.

Um sicher zu gehen, dass der in der Mutante PCPC beobachtete starke Anstieg der CiaR-Aktivität auf das Vorhandensein von *ciaH773* zurückzuführen ist und nicht auf eine andere, bis dato unbekannte Veränderung, wurde ein Stamm konstruiert, in dem PCPC statt *ciaH773* das Wildtyp-*ciaH*-Allel (ebenfalls unter der Kontrolle des Tetracyclin induzierten Promotors) enthält und die β -Galaktosidaseaktivität mit der von PCPC Δ *ciaH*ppp2_{htrA}pTEX*ciaH773* verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass durch Einbringen des Wildtyp *ciaH*-Allels (*ciaHR6*) die CiaR-Aktivität auf Wildtypniveau zurückfällt (Abbildung 4.30). Eine Hyperaktivität kann somit nur in Anwesenheit von *ciaH773* beobachtet werden.

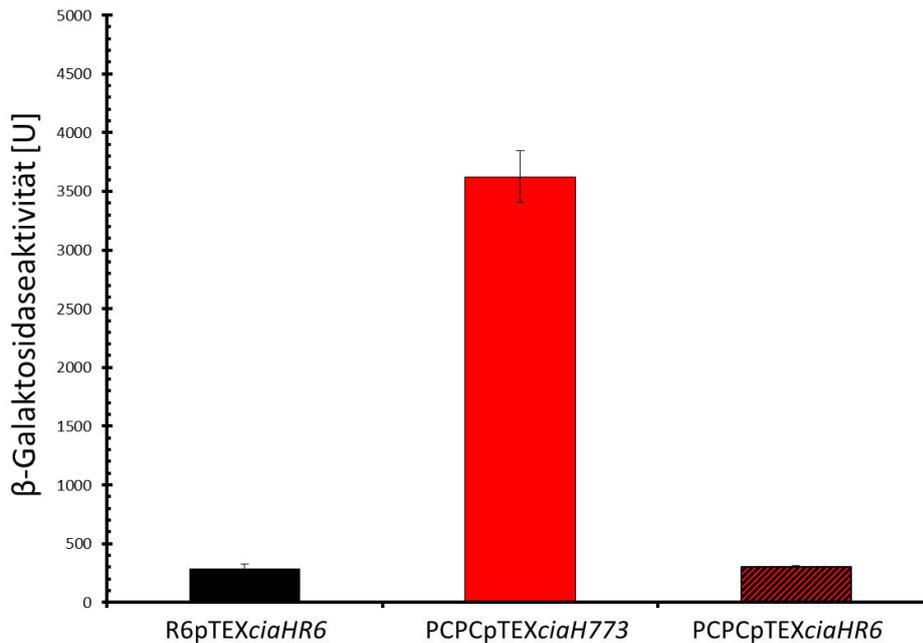


Abbildung 4.30: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit des $ciaH$ -Allels im PCPC-Hintergrund

Die Anzucht der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galactosidaseaktivität von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$, die rote, die von $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ und die schwarz-rot schattierte von $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXR6$. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Wie bereits in 4.2.2.2 erwähnt kam es in $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ zum Verlust der natürlichen Kompetenz. Um zu zeigen, dass nur $ciaH773$ für den Kompetenzverlust verantwortlich ist und keine bei der Sequenzierung unentdeckte Veränderung, wurde die Aktivität der Promotoren P_{comX} und P_{cib} auch in $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$ bestimmt.

Wie in Abbildung 4.31 klar zu erkennen, steigt durch Einbringen des Wildtyp $ciaH$ -Allels in $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}$ ($PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$) die Aktivität der Promotoren P_{comX} und P_{cib} wieder auf Wildtypniveau an. Somit kann eindeutig gezeigt werden, dass der Kompetenzverlust auf $ciaH773$ zurückzuführen ist.

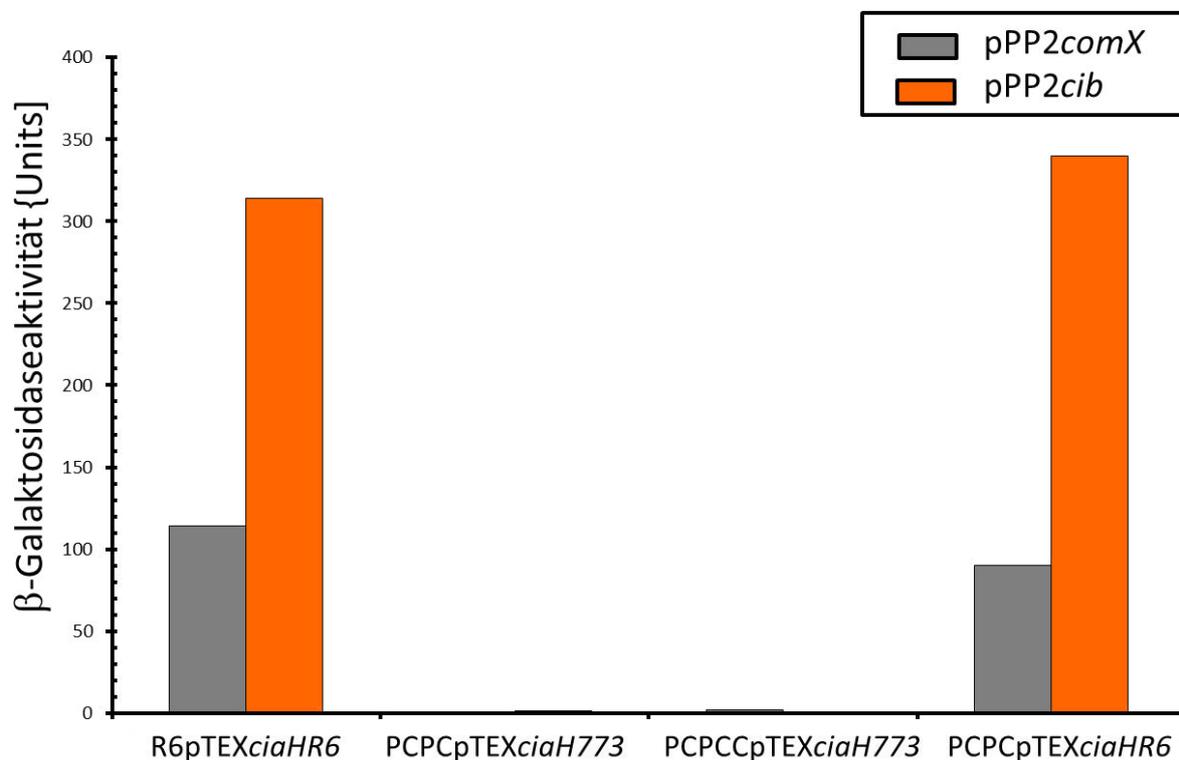


Abbildung 4.31: Aktivität der Promotoren P_{comX} und P_{cib} in Abhängigkeit des $ciaH$ -Allels

Gezeigt ist die Promotoraktivität zweier Promotoren des Kompetenzregulons in den Stämmen R6 Δ *ciaH*pTEX*ciaHR6*, PCPC Δ *ciaH*pTEX*ciaH773*, PCPCc Δ *ciaH*pTEX*ciaH773* und PCPC Δ *ciaH*pTEX*ciaHR6*. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ in C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die grauen Säulen demonstrieren die durch den Promotor P_{comX} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten, die orangenen die durch P_{cib} . Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Anschließend wurden diese Stämme auf ihre Resistenz gegen Cefotaxim getestet. Der Stamm PCPC Δ *ciaH*pPP2_{htrA}pTEX*ciaH773* weist wie bereits in 4.2.2.2.1 erwähnt eine mehr als doppelt so hohe MHK wie sein Vorgängerstamm PCP auf.

Das Einbringen des Wildtyps *ciaH*-Allels in PCPC (PCPC Δ *ciaH*pPP2_{htrA}pTEX*ciaHR6*) bewirkte einen Abfall der Cefotaximresistenz auf PCP-Niveau (Tabelle 4.7).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.7: Cefotaximresistenz in Abhängigkeit des *ciaH*-Allels

Mutante	Cefotaxim [$\mu\text{g/ml}$]
PCP	1,5
PCPC Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773</i>	4
PCPC Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXR6</i>	1,5

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentests. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ angezogen. Die Anhydrotetracyclinkonzentration im Flüssigmedium betrug 100 ng/ml, in D-Blutagar 500 ng/ml.

Im Folgenden wurde sich mit der Veränderung des fünften Selektionsschrittes, der Deletion in der Serinprotease HtrA, beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transformante PCPCC eine gesteigerte Aktivierung des CiaRH-Systems im Vergleich zu PCPC aufweist (Abbildung 4.27). Durch Sequenzierung und anschließende PCR-Analysen konnte in PCPCC eine Deletion in der Serinprotease HtrA identifiziert werden. Aufgrund der Lage dieser Deletion und den daraus resultierenden Frameshift kommt dies einem Knockout von HtrA gleich. Ob diese Deletion innerhalb der Serinprotease für den zuvor beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, oder eine andere, bis dato nicht identifizierte Veränderung des fünften Selektionsschrittes, sollte durch Nachstellen von PCPCC untersucht werden. Hierzu wurde in dem Vorgängerstamm (PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773*) *htrA* mittels einer Insertionsdeletion *htrA::aphIII* deletiert und anschließend die Auswirkung auf die Aktivität des CiaRH-Systems untersucht.

Abbildung 4.32 zeigt, dass der 1,3-fache Aktivitätszuwachs, der bereits in PCPCC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* im Vergleich zum Vorgängerstamm beobachtet werden konnte, auch durch den HtrA-Knockout in PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* erzielt wird. Die hier beobachtete Auswirkung auf das CiaRH-System ist somit rein auf die *htrA*-Deletion zurückzuführen.

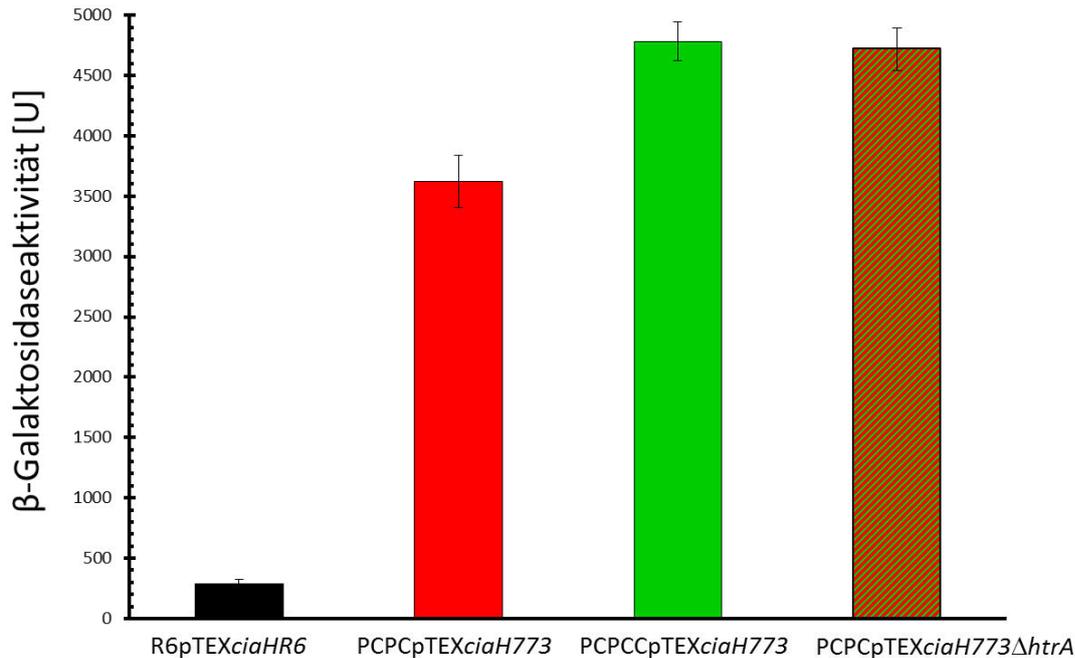


Abbildung 4.32: Nachstellen der Veränderung in PCPCC

Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ in C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$, die rote, die von $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, die grüne die von $PCPCC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, die rot-grüne schattierte die von $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Anschließend wurde der nachgestellte Stamm des fünften Selektionsschrittes, $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$, auf seine Cefotaximresistenz hin untersucht. Auf eine Untersuchung, bezüglich Kompetenzverhaltens wurde an dieser Stelle verzichtet, da wie in 4.2.3 geschildert, keine messbare Aktivitätsänderung der Promotoren P_{comX} und P_{cib} in den Mutanten des vierten und fünften Selektionsschrittes detektiert werden konnten.

Wie Tabelle 4.8 deutlich zeigt, führt die Deletion von $htrA$ in $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, der Mutante des vierten Selektionsschrittes, zu einem Anstieg der MHK auf 7 μ g/ml. Dies entspricht exakt dem Resistenzniveau von $PCPCC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$. Somit kann eindeutig gezeigt werden, dass die 10 bp Deletion in $htrA$ für den Anstieg der Cefotaximresistenz im fünften Selektionsschritt verantwortlich ist.

Tabelle 4.8: Nachstellen der Veränderung des fünften Selektionsschrittes - Cefotaximresistenz

Mutante	Cefotaxim [$\mu\text{g/ml}$]
PCPC Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}</i> pTEX <i>ciaH773</i>	4
PCPCC Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}</i> pTEX <i>ciaH773</i>	7
PCPC Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}</i> pTEX <i>ciaH773</i> Δ <i>htrA</i>	7

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentests. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ durchgeführt. Die Anhydrotetracyclinkonzentration im Flüssigmedium betrug 100 ng/ml, im D-Blutagar 500 ng/ml.

4.2.4 Das Ausschalten von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems im WT R6

Wie die bisherigen Versuche zeigten, bewirkte die *htrA*-Deletion innerhalb des fünften Selektionsschrittes einen zusätzlichen Aktivitätsanstieg des CiaRH-Systems und sicherte, durch den vermittelten Resistenzanstieg, das Überleben der Bakterien während der Selektion.

Eine Aktivitätszunahme der CiaR-abhängigen Genregulation in Folge einer *htrA*-Deletion konnte bereits in früheren Versuchen beobachtet werden (Müller, 2011). Das Ausschalten von HtrA im Wildtyp R6 steigerte die Aktivität des Zweikomponentensystems um das Dreifache. Ebenfalls wurde untersucht, wie sich eine *htrA*-Deletion auf die Aktivität eines bereits hyperaktiven CiaRH-Systems auswirkt. Hierzu wurde das *ciaH-Allel202* (Abbildung 4.20) mittels einer Janus-Konstruktion in R6 eingebracht und seine Auswirkung auf die Aktivität des CiaRH-Systems mittels β -Galaktosidaseassay bestimmt. Ähnlich wie bei dem im Fokus dieser Arbeit stehenden Allel *ciaH773*, führt *ciaH202* zu einem mehr als zehnfachen Anstieg der CiaR vermittelten Genregulation. Eine anschließende Inaktivierung von HtrA führte zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung (Müller, 2011).

Im Falle des Allels *ciaH773*, weisen die zuvor durchgeführten Versuche mit den Stämmen PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}*pTEX*ciaH773* und PCPCC Δ *ciaHpPP2_{htrA}*pTEX*ciaH773* (4.2.3) darauf hin, dass die Inaktivierung von HtrA auch im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-System die Aktivität nochmals steigert.

Ob dieser Effekt auch im Wildtyp-Background R6 zu beobachten ist, sollte durch Ausschalten von *htrA* in R6 Δ *ciaHpPP2_{htrA}*pTEX*ciaH773* mittels einer Insertionsdeletion *htrA::aphIII* und anschließender β -Galaktosidaseassays untersucht werden.

4. Ergebnisse

Die Messung der durch den Promotor P_{htrA} vermittelten β -Galaktosidaseaktivität offenbarte, dass es in Abwesenheit von HtrA zu einer weiteren Aktivitätszunahme des Zweikomponentensystems kam. Die Aktivität der CiaR-vermittelten Genregulation stieg um das 1,7-fache an (Abbildung 4.28).

Dieses Ergebnis ist konträr zu den Daten von Müller (2011), in denen eine Deletion von *htrA* zu keiner Aktivierung eines bereits hyperaktiven CiaRH-Systems führt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt spezifisch für das Allel *ciaH773* ist, oder auch auf andere, sich ähnlich verhaltende Allele angewendet werden kann, wurde auch das Allel *ciaH202* untersucht. Im Gegensatz zu Müller (2011) wurde hierzu der Stamm, R6 Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH202* (Huber, 2012; Laux, 2014) verwendet, in dem das Allel *ciaH202* unter der Kontrolle des Tetracyclin induzierten Promotors steht. Hierdurch sollte das Auftreten von Sekundärmutationen verhindert werden, die die Aktivität eines stark aktivierten CiaRH-Systems wieder herabsetzen. Das Ausschalten von HtrA erfolgte wiederum mittels Insertionsdeletion *htrA::aphIII*.

Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität zeigte, dass auch im Falle des Allels *ciaH202* eine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war. Die CiaR-vermittelte Genregulation erhöhte sich um das 1,6-fache (Abbildung 4.33).

Insgesamt konnte die Aktivität des CiaRH-Systems des Wildtypstammes R6 durch Einbringen eines der beiden Allele, *ciaH773* bzw. *ciaH202* und anschließenden Knockout von HtrA um das 18-fache gesteigert werden.

Eine Antwort darauf, warum die Daten nicht mit denen von Müller (2011) übereinstimmen, könnte in der Instabilität der Stämme zu finden sein. Im früheren Arbeiten (Müller, 2011; Laux, 2014), sowie auch im Zuge dieser Arbeit fiel auf, dass es bei einem hyperaktiven CiaRH-System vermehrt zu Punktmutationen kommt, die eine Aktivitätsminderung zur Folge haben. Dies war umso ausgeprägter, je stärker die Aktivierung war. Möglicherweise ereigneten sich in der Arbeit von Müller (2011) aufgrund der, durch das Fehlen von HtrA nochmals gesteigerten Aktivität, sekundäre Mutationen die die Aktivität des CiaRH-Systems herab senkten.

4. Ergebnisse

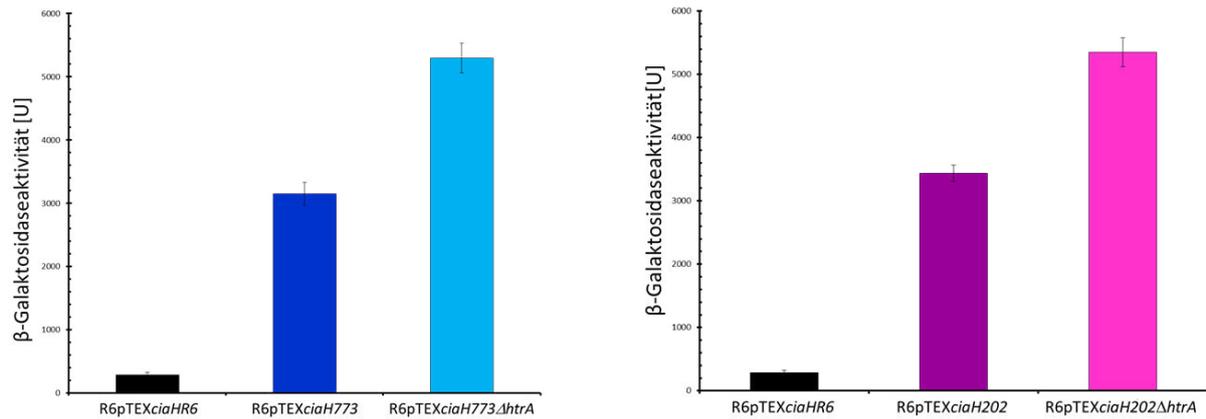


Abbildung 4.33: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit des $ciaH$ -Allels in An- und Abwesenheit von HtrA.

Die Anzucht der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die Säulen zeigen die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität. Jede Säule repräsentiert die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Säulen zeigen die Werte des Wildtypstammes R6 Δ ciaHpTEXciaHR6. Links sind die Messergebnisse für das Allel $ciaH773$, rechts für $ciaH202$ dargestellt. Dabei repräsentiert die blaue Säule die Messergebnisse für R6 Δ ciaHpTEXciaH773, die türkise, die für R6 Δ ciaHpTEXciaH773 Δ htrA, die violette, die für R6 Δ ciaHpTEXciaH202 und die rosa-farbene zeigt die erzielten Werte für R6 Δ ciaHpTEXciaH202 Δ htrA an. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die $htrA$ -Deletion in R6 Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773 und R6 Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH202 auf die Cefotaximresistenz hat. Die mittels Tropfentest erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Es zeigt sich, dass weder bei R6 Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773, noch bei R6 Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH202 die $htrA$ -Deletion sich auf die Cefotaximresistenz auswirkt.

Tabelle 4.9: Cefotaximresistenz bei An- und Abwesenheit von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems

Mutante	Cefotaxim [$\mu\text{g/ml}$]
R6 Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH77</i>	0,015
R6 Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773</i>	0,035
R6 Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH202</i>	0,035
R6 Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773ΔhtrA</i>	0,035
R6 Δ <i>ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH202ΔhtrA</i>	0,035

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentests. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ durchgeführt. Die Anhydrotetracyclinkonzentration im Flüssigmedium betrug 100 ng/ml, in D-Blutagar 500 ng/ml.

4.2.4.1 Globale Transkriptionsanalyse – Der Einfluss von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems

Im voran gegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass durch Abwesenheit von HtrA die Aktivität eines bereits aktivierten CiaRH-Systems nochmal gesteigert werden kann.

Um mehr über die Feedbackregulation von HtrA auf ein bereits hyperaktives CiaRH-System zu erfahren, wurden Transkriptomanalysen mit den Stämmen R6 Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* und R6 Δ *ciaHpTEXppP2_{htrA}ciaH773 Δ htrA* durchgeführt und die Transkriptomprofile anschließend miteinander verglichen.

Beide Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,4$ herangezogen. Die Induktion der Stämme fand zu Beginn des Wachstums mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin statt.

Die Ergebnisse dieser Transkriptomanalyse können der Abbildung 4.29 entnommen werden.

Zur besseren Übersicht, wurden die Gene, die dem Kompetenzregulon angehören rot gekennzeichnet (Peterson *et al.*, 2004). Blau hervorgehoben sind Gene, die durch den transkriptionellen Regulator CcpA (catabolite control protein A) reguliert werden (Carvalho *et al.*, 2011). Aufgrund der starken Veränderung konnte *htrA* nicht in Abbildung 4.34 dargestellt werden, ist aber in Tabelle 4.10 grün hervorgehoben.

4. Ergebnisse

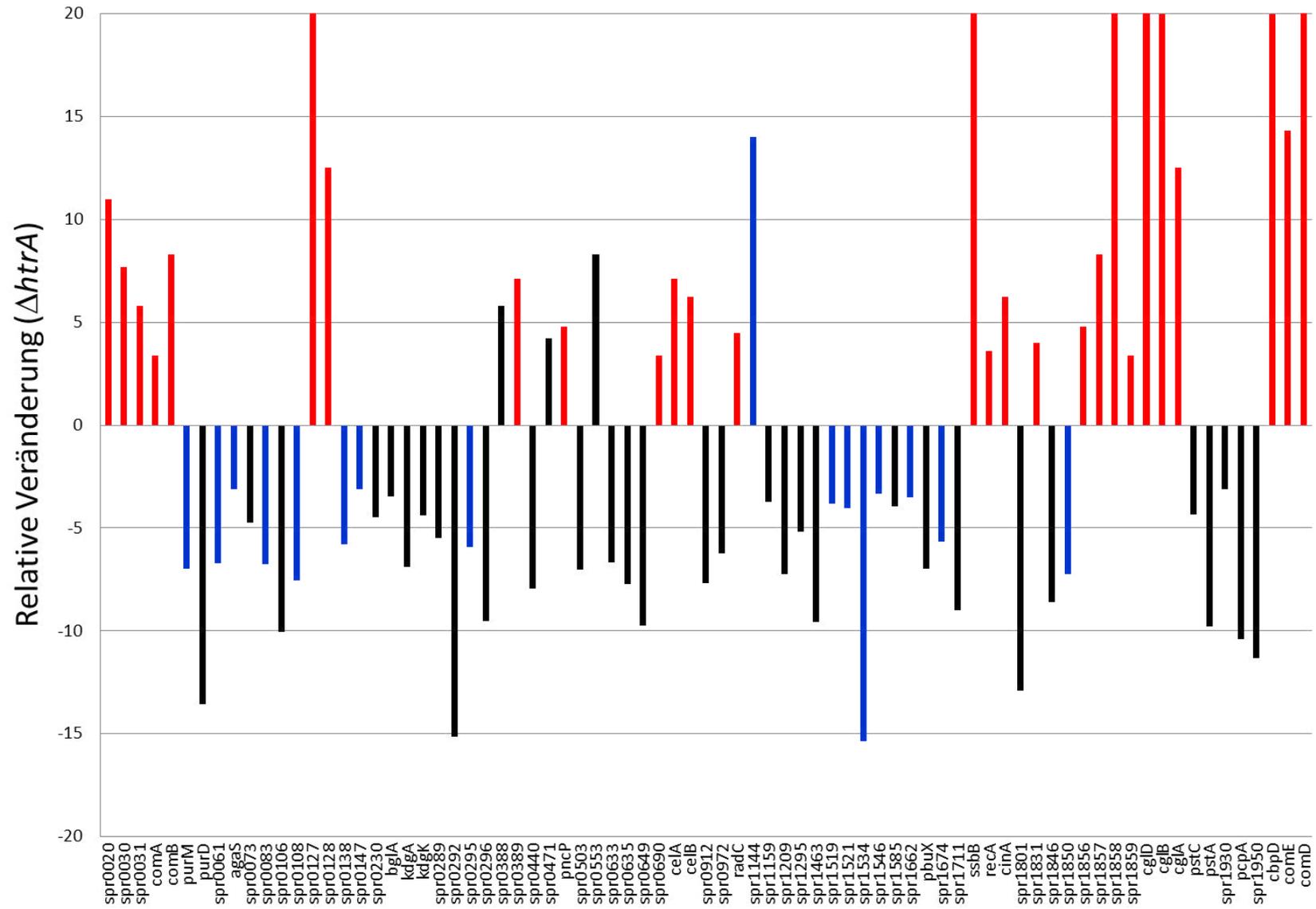


Abbildung 4.34: Vergleich der Transkriptome von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ und $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$

Dargestellt ist die relative Veränderung der in der Transkriptomanalyse als signifikant erschienenen Gene von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ im Vergleich zu $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$. Gene wurden dann als signifikant angesehen, wenn sie ein mindestens dreifach erniedrigtes beziehungsweise dreifach erhöhtes Transkriptverhältnis gegenüber dem Vergleichsstamm aufwiesen und einen P-Value von unter 0,03 besaßen. Die Gesamt-RNA wurde auf einer in C+Y-Medium (pH 7,8) exponentiell wachsender Kultur bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ extrahiert. Die Anhydrotetracyclinzugabe erfolgte vor Beginn des Wachstums mit einer Konzentration 100 ng/ml. Auf der x-Achse sind die Gennamen bzw. Gennummern aufgetragen, die relative Veränderung können der y-Achse entnommen werden. Die Balken repräsentieren die relativen Veränderungen von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ im Vergleich zu $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$. Rot markiert sind hierbei die Gene, die dem Kompetenzregulon angehören, CcpA-regulierte Gene, sind blau hervorgehoben.

Die Funktionen der innerhalb der Transkriptionsstudie identifizierten Gene sind in der Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10: Gene, Funktionen und relative Veränderungen der Transkriptomanalyse von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ gegen $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$

GenNr.	Genname	Rel. Veränderung	Funktion
<i>spr0020</i>		11	Hypothetisches Protein
<i>spr0030</i>		7,7	Hypothetisches Protein
<i>spr0031</i>		5,8	Hypothetisches Protein
<i>spr0043</i>	<i>comA</i>	3,4	Kompetenzprotein ComA
<i>spr0044</i>	<i>comB</i>	8,3	Kompetenzprotein ComB
<i>spr0048</i>	<i>purM</i>	-6,99	Phosphoribosylaminoimidazol Synthetase
<i>spr0052</i>	<i>purD</i>	-13,55	Phosphoribosylamineglycin Ligase
<i>spr0061</i>		-6,72	PTS System IIC Komponente
<i>spr0064</i>	<i>agaS</i>	-3,11	Zuckerisomerase AgaS
<i>spr0073</i>		-4,74	Hypothetisches Protein
<i>spr0083</i>		6,8	ABC Transporter
<i>spr0106</i>		10,0	Transporter
<i>spr0108</i>		-7,6	Hypothetisches Protein
<i>spr0127</i>		25	Hypothetisches Protein
<i>spr0128</i>		12,5	Hypothetisches Protein
<i>spr0138</i>		-5,80	Hypothetisches Protein
<i>spr0147</i>		-3,12	Lipoprotein
<i>spr0230</i>		-4,49	PTS System IIB Komponente
<i>spr0244</i>	<i>bglA</i>	-3,46	6-Phospho- β -Glukosidase
<i>spr0287</i>	<i>kdgA</i>	-6,89	Keto-Hydroxyglutarat Aldolase
<i>spr0288</i>	<i>kdgK</i>	-4,41	2-Keto-3-Deoxygluconat Kinase
<i>spr0289</i>		-5,47	Hypothetisches Protein
<i>spr0292</i>		-15,13	Glucuronylhydrolase
<i>spr0295</i>		-5,91	PTS System IID Komponente

4. Ergebnisse

GenNr.	Genname	Rel. Veränderung	Funktion
<i>spr0296</i>		-9,54	Preprotein translocase, YajC subunit
<i>spr0388</i>		5,8	Hypothetisches Protein
<i>spr0389</i>		7,1	Hypothetisches Protein
<i>spr0440</i>		-7,96	Endo- β -N-Acetylglucosaminidase
<i>spr0471</i>		4,2	Hypothetisches Protein
<i>spr0474</i>	<i>pncP</i>	4,8	ABC Transporter
<i>spr0503</i>		-7	Hypothetisches Protein
<i>spr0553</i>		8,3	Hypothetisches Protein
<i>spr0633</i>		-6,66	Hypothetisches Protein
<i>spr0635</i>		-7,71	Hypothetisches Protein
<i>spr0649</i>		-9,75	Regulator of the multidrug efflux pump pmrA
<i>spr0690</i>		3,4	Hypothetisches Protein
<i>spr0856</i>	<i>celA</i>	7,1	Kompetenzprotein CelA
<i>spr0857</i>	<i>celB</i>	6,25	Kompetenzprotein CelB
<i>spr0912</i>		-7,66	Hypothetisches Protein
<i>spr0972</i>		-6,22	Hypothetisches Protein
<i>spr0996</i>	<i>radC</i>	4,5	DNA-Reparaturprotein RadC
<i>spr1144</i>		14	DNA processing protein DprA
<i>spr1159</i>		-3,72	Hypothetisches Protein
<i>spr1209</i>		-7,24	Hypothetisches Protein
<i>spr1295</i>		-5,17	Hypothetisches Protein
<i>spr1463</i>		-9,58	Hypothetisches Protein
<i>spr1519</i>		-3,81	Glucokinase
<i>spr1521</i>		-4,03	N-Acetylneuraminat Lyase UE
<i>spr1534</i>		-15,35	ABC Transporter Substrate-binde Protein - Zuckertransport
<i>spr1546</i>		-3,31	ABC Transporter
<i>spr1585</i>		-3,96	Hypothetisches Protein
<i>spr1662</i>		-3,52	Xanthine Phosphoribosyltransferase
<i>spr1663</i>	<i>pbuX</i>	-6,98	Xanthine Permease
<i>spr1674</i>		-5,66	Hypothetisches Protein
<i>spr1711</i>	<i>msmF</i>	-8,98	ABC Transporter
<i>spr1724</i>	<i>ssbB</i>	25	DNA-binde Protein
<i>spr1757</i>	<i>recA</i>	3,6	DNA-Reparaturprotein recA
<i>spr1758</i>	<i>cinA</i>	6,25	Kompetenzprotein
<i>spr1801</i>		-12,91	ABC transporter
<i>spr1831</i>		4	Hypothetisches Protein
<i>spr1846</i>		-8,59	Hexulose-6-phosphat Synthase (HumpS)
<i>spr1850</i>		-7,23	Hypothetisches Protein
<i>spr1856</i>		4,80	Hypothetisches Protein
<i>spr1857</i>		8,30	Hypothetisches Protein
<i>spr1858</i>		25,00	Hypothetisches Protein
<i>spr1859</i>		3,40	Hypothetisches Protein
<i>spr1861</i>	<i>cglD</i>	25,00	Kompetenzprotein

GenNr.	Genname	Rel. Veränderung	Funktion
<i>spr1863</i>	<i>cglB</i>	20,00	Kompetenzprotein
<i>spr1864</i>	<i>cglA</i>	12,50	Kompetenzprotein
<i>spr1896</i>	<i>pstC</i>	-4,34	Phosphat ABC Transporter Permease ABC Transporter Membran-spanning Permease -
<i>spr1897</i>	<i>pstA</i>	-9,79	Phosphat Transport
<i>spr1930</i>		-3,11	Hypothetisches Protein
<i>spr1945</i>	<i>pcpA</i>	-10,38	Choline-binde Protein
<i>spr1950</i>		-11,32	Hypothetisches Protein
<i>spr2006</i>	<i>cbpD</i>	20,00	Cholin-binde Protein D
<i>spr2041</i>	<i>comE</i>	14,30	Responseregulator ComE
<i>spr2042</i>	<i>comD</i>	25,00	Histidinkinase ComD
<i>spr2045</i>	<i>sphtra</i>	-706,81	Serinprotease HtrA

Der Vergleich der Transkriptome von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ im Vergleich zu $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ zeigte, dass 78 Gene eine signifikant veränderte Transkriptmenge aufwiesen. Nahezu alle, durch den Knockout von *htrA* hochregulierte Gene können als Mitglieder des Kompetenzregulons identifiziert werden (Peterson *et al.*, 2004), in Abbildung 4.34 rot hervorgehoben. Darunter auch die Histidinkinase und der Responseregulator des Zweikomponentensystem ComDE.

Ein Teil, der runterregulierten Gene, konnte als Gene identifiziert werden, die durch den transkriptionellen Regulator CcpA reguliert werden (Carvalho *et al.*, 2011). Bei CcpA handelt es sich um ein globales Regulatorprotein des Zentralmetabolismus, das weit verbreitet unter den gram positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt ist. CcpA gehört zu den Hauptregulatoren des Kohlenstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien und übt eine entscheidende Rolle in der Katabolitrepression aus.

4.2.4.2 Auswirkungen der Deletion der Serinprotease HtrA auf die PBP2x-Menge

In dem vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die *htrA*-Deletion für den Resistenzanstieg des fünften Selektionsschrittes verantwortlich ist. Wie genau HtrA mit der Resistenzentstehung in Verbindung steht ist nicht bekannt. Frühere Studien (Peters, 2013) liefern Hinweise, dass HtrA das essentielle PBP2x von *S. pneumoniae* abbauen kann. Dieser Abbau wurde vor allem für veränderte PBP2x-Derivate beobachtet (Peters, 2013).

Aufgrund dessen wurde die PBP2x-Menge in den Mutanten des vierten und fünften Selektionsschrittes ($PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, $PCPCC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$) untersucht.

4. Ergebnisse

Zu den Westernblotanalysen wurden die Mutante des dritten Selektionsschritts PCP und PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 Δ htrA ebenfalls herangezogen.

Die Immunoblot-Analysen (Abbildung 4.35) offenbarten, dass PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 eine minimal reduzierte PBP2x-Menge wie der Vorgängerstamm PCP aufweist. Diese verminderte PBP2x-Menge kann durch eine Deletion von *htrA* (PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 Δ htrA) wieder aufgehoben werden. Die PBP2x-Menge entspricht der in PCPCC, bei dem es sich ebenfalls aufgrund der 10 bp-Deletion des fünften Selektionsschrittes um einen *htrA*-Deletionsmutante handelt.

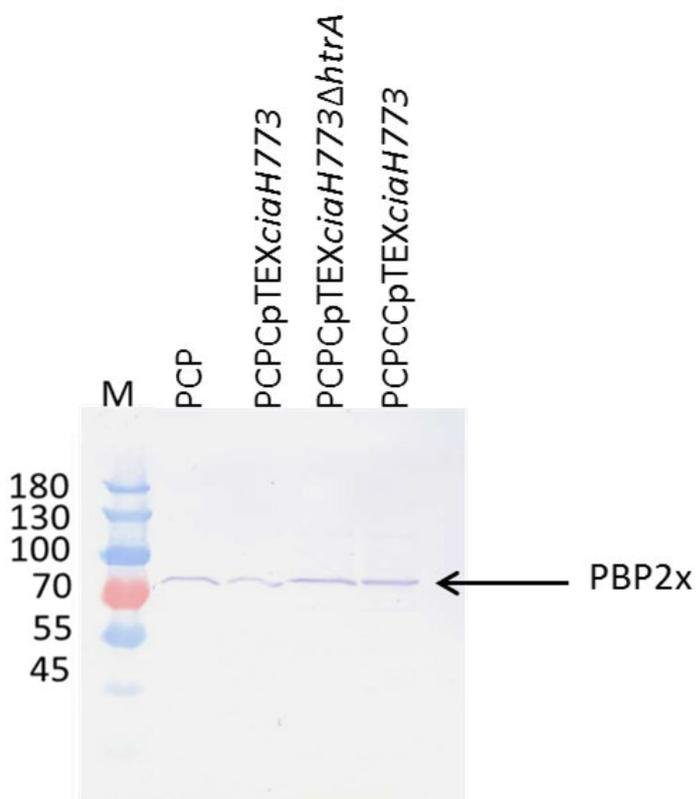


Abbildung 4.35: Westernblot zur Bestimmung der PBP2x-Menge

Dargestellt sind die Westernblotanalysen zur Bestimmung der PBP2x-Menge in An- und Abwesenheit von HtrA. Die Präparation der Zellysate erfolgte wie in 3.2.18 beschrieben, die Auftrennung erfolgte über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel. Der primäre Antikörper (Anti-PBP2x, Hakenbeck *et al.*, 1991) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000, der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit) in einer Verdünnung von 1:30.000 eingesetzt. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde der peqGold IV Marker (M) aufgetragen. Das berechnete Molekulargewicht von PBP2x beträgt 82 kDA.

4.2.5 Die rätselhafte Rolle der Punktmutation in *spr1992*

Im Zuge der Sequenzierung des Stammes PCPC wurde neben der Veränderung in der Histidinkinase CiaH noch eine weitere Punktmutation in dem hypothetischen Gen *spr1992* identifiziert. Diese Punktmutation (t815c) führte zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin an Position 272 des 475 Aminosäuren langen Proteins. Blast-Analysen dieses Genes offenbarten das Vorhandensein eines Helix-Turn-Helix-Motivs, ein Strukturelement, das oft bei bakteriellen Transkriptionsregulatoren vorzufinden ist.

Die Veränderung in *spr1992* entstand während der Selektion auf Cefotaxim. Dies alleine heißt jedoch noch nicht, dass es sich hierbei um eine Resistenzdeterminante handelt, besonders da sich in diesem fünften Selektionsschritt noch eine Mutation (*ciaH773*) ereignet hat. Aufgrund der natürlichen Mutationsrate könnte es sich hierbei auch um eine, sich zufällig ereignete Veränderung handeln.

Um mehr über den Beitrag der Punktmutation in *spr1992* zu erfahren, wurde *ciaH773* in PCP eingebracht. Der daraus resultierende Stamm $PCP\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ und $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ unterscheiden sich laut den Ergebnissen der Genomsequenzierung (4.2.1.1) nur noch durch die Anwesenheit der Punktmutation in *spr1992*. Anschließend wurden die Stämme auf ihre Cefotaximresistenz, sowie die Aktivität des CiaRH-Systems hin untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.36 dargestellt.

Durch Einbringen des *ciaH773*-Allels in PCP wurde die CiaR-abhängige Genregulation deutlich gesteigert, allerdings konnte die β -Galaktosidaseaktivität von PCPC nicht vollständig erreicht werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Untersuchung der MHK gegenüber Cefotaxim. Auch hier erhöhte sich die Resistenz nach Einführung von *ciaH773* in PCP deutlich (1,5 \rightarrow 3,25 μ g/ml), das Resistenzniveau von PCPC konnte allerdings nicht erzielt werden. Laut Sequenzanalyse unterscheiden sich die beiden Mutanten PCPC und PCP nur durch die beiden Punktmutationen in *ciaH* und *spr1992*. Dies würde bedeuten, dass die Mutation in *spr1992* sowohl einen Beitrag zur Aktivierung des CiaRH-Systems, wie auch zur Resistenz gegenüber Cefotaxim leistet. Dieser Effekt kann nur bei bereits gesteigerter CiaR-Aktivität beobachtet werden. Der Stamm $PCPC\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6$ (4.2.3.1), der das Wildtyp *ciaH* unter der Kontrolle des Tetracyclininduzierten Promotors enthält, weist die gleiche β -Galaktosidaseaktivität wie R6 auf. Ein stimulierender Effekt durch das Vorhandensein der *spr1992*-Punktmutation kann nicht verzeichnet werden.

4. Ergebnisse

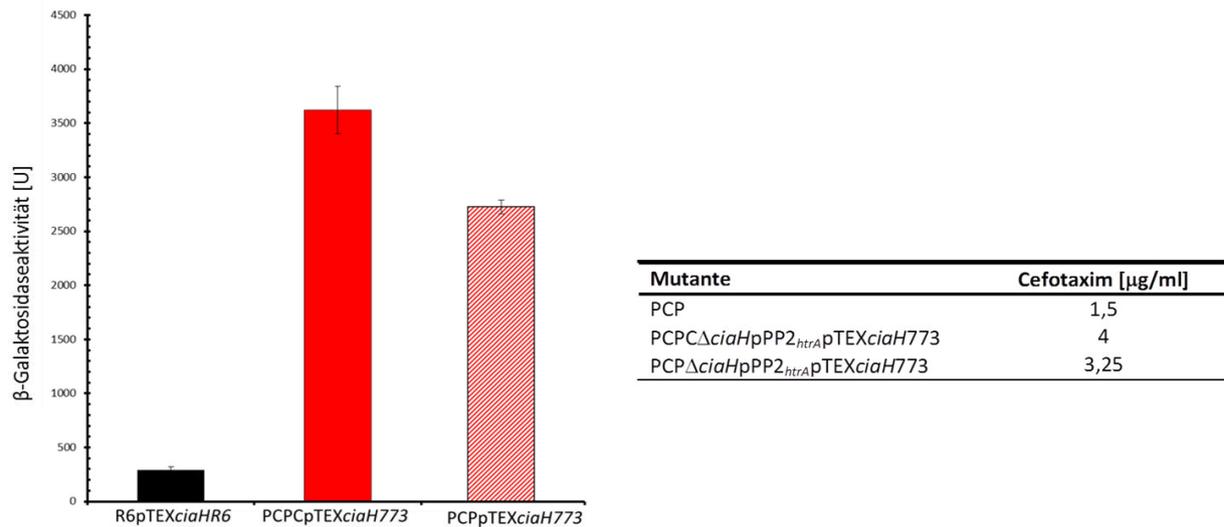


Abbildung 4.36: Der Einfluss der Punktmutation in *spr1992* auf das CiaRH-System und die Cefotaximresistenz

Links ist das Ergebnis der β -Galaktosidaseassays der Stämme R6 Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6, PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 und PCP Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 dargestellt. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer OD₆₀₀= 0,8 im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von R6 Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6, die rote, die von PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773, die rot-weiß-schattierte die von PCP Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Rechts sind die Ergebnisse des Tropfentest zur Bestimmung der MHK für Cefotaxim für die Stämme PCP, PCPC Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 und PCP Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 dargestellt. Die Inkubation der Stämme fand im C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer OD₆₀₀= 0,3 statt. Zur Inkubation im Flüssigmedium wurde eine Anhydrotetracyclinkonzentration von 100 ng/ml, zur Inkubation auf Festmedium eine Konzentration von 500 ng/ml verwendet.

Über die Funktion des Genes *spr1992* ist sehr wenig bekannt. Somit ist es sehr schwierig eine Aussage darüber zu treffen wie die Punktmutation Einfluss auf die bis dato unbekannt Genfunktion nimmt. Denkbar wäre sowohl ein aktivierender, wie auch inhibierender Effekt. Gleichzeitig könnte diese Punktmutation auch zu einem vollständigen Funktionsverlust führen, wie bereits zu Beginn dieser Arbeit bei der Glycosyltransferase CpoA von P104 gezeigt wurde (4.1.2.1.1).

Um dies zu überprüfen, wurde *spr1992* mittels Insertionsdeletion 1992::*aphIII* in den Stämmen R6 Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 und PCP Δ ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773 deletiert. Es wurde sich somit für den Wildtyp und die Mutante des dritten Selektionsschrittes entschieden. Da der Effekt der *spr1992*-Punktmutation nur in der Anwesenheit eines hyperaktiven CiaRH-Systems beobachtet werden konnten, wurde die Deletion in Stämme mit hyperaktivem genetischem Hintergrund eingebracht. Anschließend wurden die Stämme bezüglich ihrer β -Galaktosidaseaktivität untersucht.

4. Ergebnisse

Abbildung 4.37 zeigt, dass sowohl bei $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, als auch bei $PCP\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, durch das Fehlen von *spr1992*, kein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivität des CiaRH-Systems zu verzeichnen ist.

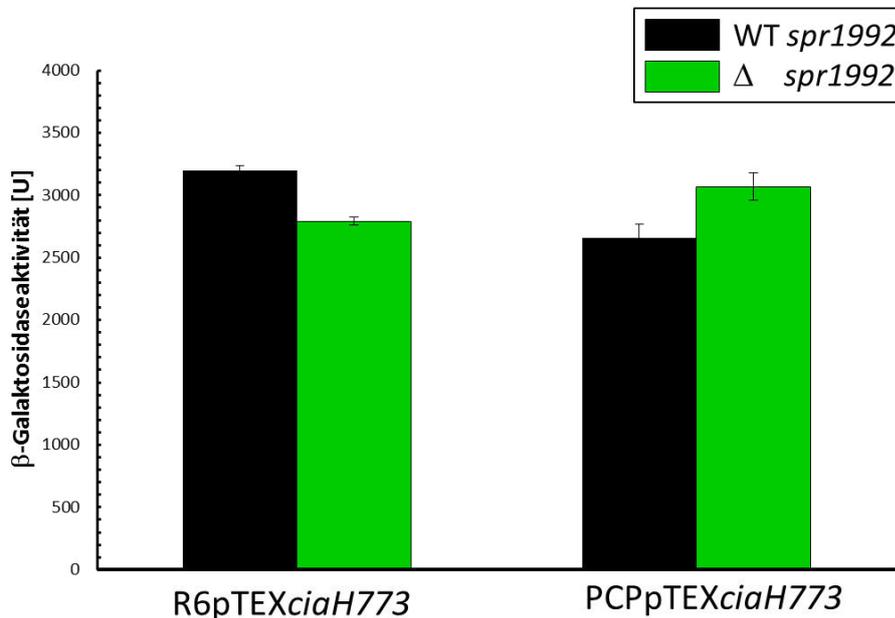


Abbildung 4.37: Auswirkung der *spr1992*-Deletion auf die Aktivität des CiaRH-Systems

Dargestellt ist das Ergebnis des β -Galaktosidaseassays der Stämme $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$, $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta spr1992$, $PCP\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ und $PCP\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta spr1992$. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium. Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarzen Säulen repräsentieren die Stämme mit Wildtyp *spr1992*, die Grünen die mit Knockout *spr1992*. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Das Gen *spr1992* war bereits Gegenstand von mehreren vorangegangenen Arbeiten (Kirsch, 2011; Bugaeva, 2013; Bugaeva, 2014). So tauchte es auf einer Liste von potentiellen Zielgenen der csRNA auf. Die nachfolgenden in vivo Arbeiten führten zu kontroversen Ergebnissen. Während die Transkriptionsfusion ($pPT2_{spr1992}$), die Messung der Promotorstärke eine Promotoraktivität bescheinigte, die mit rund 100 Units, einem mittelstarken Promotor entspricht, konnte in der nachfolgenden Translationsfusion ($pPT2_{spr1992}$) keine Expression der β -Galaktosidaseaktivität mehr detektiert werden (Kirsch, 2011).

Das Translationsprobe pTP2 enthält im Gegensatz zum Promotorprobep lasmid pPP2 keine Signale zur Initiation der Translation. Um β -Galaktosidaseaktivität zu erhalten müssen dementsprechend die

4. Ergebnisse

Signale zur Initiation der Translation, sowie ein Startcodon in pTP2 kloniert werden. Im Gegensatz dazu besitzt das *'lacZ*-Gen in pPP2 sowohl eine Ribosomenbindestelle wie auch ein Startcodon.

Da in pPP2_*spr1992* im Gegensatz zu pPT2_*spr1992* eine β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden konnte, lässt dies auf die Existenz einer Repressorbindestelle schließen. Die Klonierung eines verlängerten Promotorfragmentes vor *'lacZ* in pPP2 (pPP2_*spr1992*_R) führte ebenfalls zu keiner messbaren Promotoraktivität (Abbildung 4.33), was wiederum die Existenz einer Repressorbindestelle upstream des *spr1992*-Promotors nahe legt.

In Abbildung 4.33 ist die Sequenz des Promotorbereiches von *spr1992* dargestellt. Der bereits vermessene Promotor (pPP2_*spr1992*), innerhalb der Abbildung türkis markiert, besitzt keine -35-Region, aber vor dem vorhergesagten +1 eine ausgedehnte -10 Region (ext. -10). Bei genauer Betrachtung der Sequenz fällt noch ein weiterer potentieller Promotor upstream des bereits vermessenen Promotor auf (in Abbildung 4.38 gelb hervorgehoben).

```
GTGTTTACTG ATTTTCAGGA TAATGGACCA GGAAATCAGC ATGAAAATAA AAAAGAGAAAC
                                     -35

AGATTATTTT AGCATTGTC AGATTTATGC TATGCTTAAG GTAGAAAATG AAAGGGGTAA
-10          +1          ext. -10          +1

CAAATGTATT TAGGAGATTT GATGGAGAAA GCCGAGGATC CAGAG
                Repeat
```

Abbildung: 4.38: Genetische Organisation des Promotorbereiches von *spr1992*

Dargestellt ist der Sequenzbereich vor *spr1992*. Gelb hinterlegt ist die Promotorregion des putativen ersten Promotors, türkis, die des bereits vermessenen zweiten Promotors. Der Repeat ist rot hervorgehoben.

In Zuge einer Bachelorarbeit (Forler, 2014) wurde überprüft, ob es sich bei diesem zweiten putativen Promotor, um den tatsächlichen Promotor von *spr1992* handelt. Hierzu wurde dieser Promotor vor das promotorlose *'lacZ* kloniert (pPP2_*spr1992*_PT). Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität offenbarte keinerlei Aktivität. Somit handelt es sich demnach nicht um den Promotor von *spr1992*.

Innerhalb der Sequenz downstream des *spr1992*-Promotors konnte eine mögliche Repressorbindestelle identifiziert werden, ein Repeat. Um mehr über die Bedeutung dieses Repeats für die Regulation von *spr1992* zu erfahren, wurden im Zuge einer Bachelorarbeit (Forler, 2014) ein Konstrukt kloniert, bei dem der Repeat durch gezielte Klonierung zerstört wurde (pPP2_*spr1992*_OR, Abbildung 4.39). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass nur die Hälfte des Repeats vor *'lacZ*

4. Ergebnisse

kloniert wurde. Das anschließend durchgeführte β -Galaktosidaseassay erbrachte eine Expressionsstärke von rund zehn Units (Abbildung 4.34).

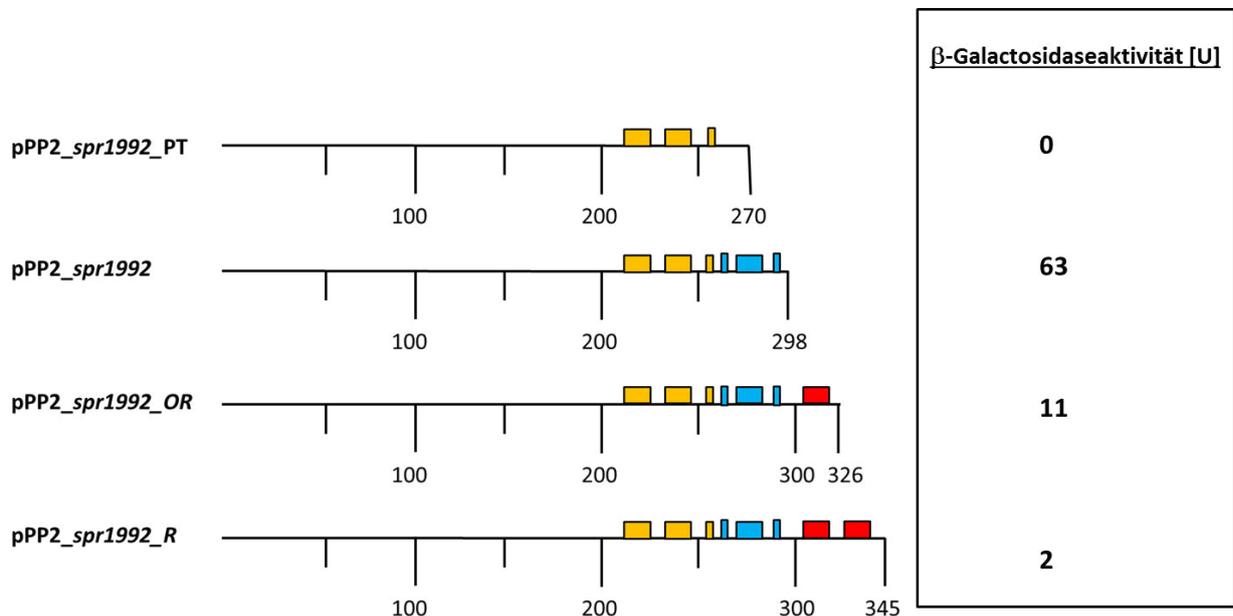


Abbildung 4.39: Schematische Darstellung der Transkriptionsfusionen

Gezeigt ist der schematische Aufbau der Transkriptionsfusionen des Promotorbereiches von *spr1992*. Als Reporterplasmid wurde pPP2 verwendet. Die farbigen Blöcke kennzeichnen dabei den jeweiligen Promotorbereich bzw. den Repeat. Die gelben Blöcke symbolisieren den Promotorbereich des ersten putativen Promotors von *spr1992* (-35, -10 und +1-Region), die türkisen, die von Promotorbereich 2 (erweiterte -10 und +1-Region). Der Repeat ist rot hervorgehoben.

Der Anstieg der Transkriptrate legt nahe, dass es sich bei dem Repeat tatsächlich um die spezifische Erkennungssequenz einer unbekanntem Repressorbindestelle eines ebenso unbekanntem Repressors handelt. Die Expressionsstärke lag allerdings immer noch deutlich unterhalb von pPP2_*spr1992*, bei welcher der Repeat nicht Teil der Transkriptionsfusion ist. Dies lässt vermuten, dass durch Halbierung des Repeats die Repressor-Bindestelle nicht vollständig deletiert wurde. Folglich ist noch ein Teil der Repressorerkennungssequenz vorhanden. Die Affinität des Repressors gegenüber dieser verkürzten Erkennungssequenz sinkt, es kommt zu einer verminderten Repression und folglich zu einer erhöhten Transkriptrate.

Ein Protein-Blast für das von *spr1992* codierte Protein offenbarte eine helix-turn-helix Domäne. Bei Helix-turn-helix-Motiven handelt es sich um ein Sekundärstrukturelement von Proteinen, die sich aus zwei α -Helices zusammensetzen, die durch eine β -Schleife verbunden sind und häufig in Transkriptionsregulatoren von Bakterien vorkommen. *Spr1992* codiert demnach für ein DNA-Bindeprotein. Im Zuge einer Bachelorarbeit wurde deshalb auch die Möglichkeit einer Autoregulation untersucht (Forler, 2014). Hierzu wurde *spr1992* mittels einer Kanamycinkassette *spr1992::apHIII*

deletiert. Ein signifikanter Anstieg der Transkriptrate konnte hierbei nicht beobachtet und somit eine Autoregulation ausgeschlossen werden.

4.2.6 Veränderung in PCPCCO - die Punktmutation in *pbp2b*

Im dritten Selektionsschritt kam es zur teilweisen Übertragung von PBP2b aus Uo5 auf R6. Der ausgetauschte Sequenzabschnitt endete bei Base 1350 und begann 320 Basen vor dem PBP2b-Startcodon. Die Transpeptidasedomäne, die sich bei PBP2b von Base 1035 bis 2010 (AS 345-670) erstreckt, war somit nur teilweise durch Uo5-DNA ersetzt.

Die Sequenzanalysen (4.2.1.1) zeigten, dass sich in PCPCCO eine Punktmutation (a1217c) ereignet hatte, die einen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Prolin an Position 406 zur Folge hat. Diese befindet sich innerhalb des Uo5-Sequenzbereiches, in der Transpeptidasedomäne. Die genetische Organisation von *pbp2b* in PCP und PCPCCO, sowie die Lage der Punktmutation sind in Abbildung 4.40 schematisch dargestellt.

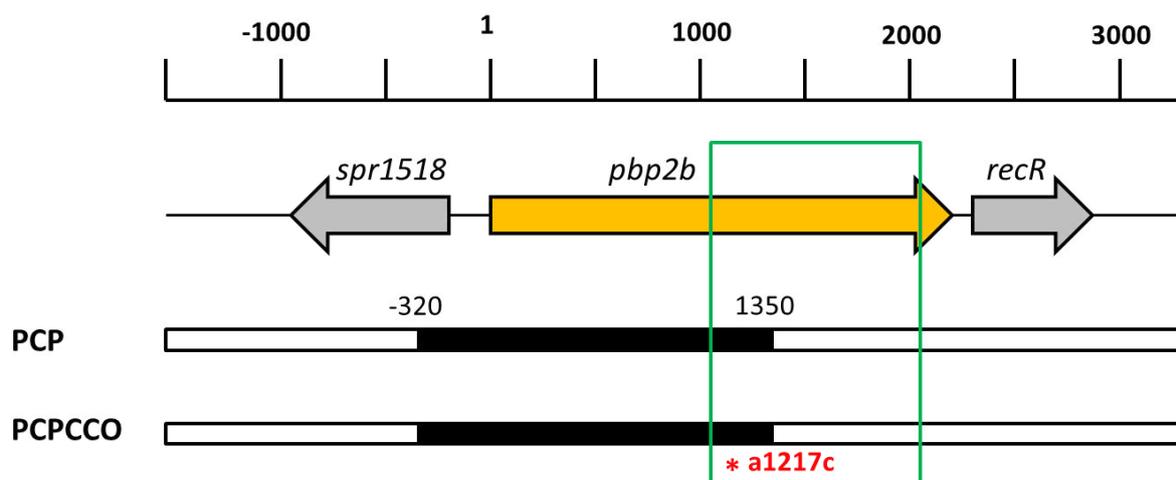


Abbildung 4.40: Genetische Organisation von *pbp2b* aus R6, PCP und PCPCCO

Dargestellt ist die genetische Organisation von *pbp2b* aus R6, PCP und PCPCCO. Die Pfeile symbolisieren die einzelnen Gene. Die schwarz-weißen Kästen stellen das *pbp2b* der Transformanten PCP und PCPCCO dar. Hierbei stehen die weißen Bereiche für Sequenzabschnitte aus R6, die schwarzen stellen die aus Uo5 dar. Als 1 ist die erste Base von *pbp2b* definiert, die angegebenen Grenzen der ausgetauschten Bereiche sind als Entfernung von dieser ersten Base angegeben. Die Transpeptidase-Domäne von *pbp2b* ist durch ein grünes Rechteck gekennzeichnet. Der rote Stern kennzeichnet die Punktmutation in PCPCCO.

Die Punktmutation in *pbp2b* war die einzige Veränderung, die im sechsten Selektionsschritt identifiziert werden konnte (4.2.1.1). Die Untersuchung der MHK (Tabelle 4.3) zeigte, dass in PCPCCO

4. Ergebnisse

ein Resistenzanstieg für Piperacillin (5,5 → 7 µg/ml) und Oxacillin (26-34 µg/ml) vermittelt wurde. Für Cefotaxim wurde keine weitere Steigerung des Resistenzniveaus beobachtet. Dies bestätigt früheren Daten, die besagen, dass PBP2b nicht mit Cephalosporinen der dritten Generation, zu denen auch Cefotaxim gehört, interagieren. Die Resistenz gegenüber Cefotaxim wird nur über Veränderungen in PBP2x und PBP1a erreicht (Coffey *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1997). Das Ergebnis der Resistenzuntersuchung legt somit schon einmal nahe, dass es die identifizierte *pbp2b*-Mutation ist, die den Resistenzanstieg in PCPCCO vermittelt. Um weitere Hinweise zu Beteiligung dieser Veränderung zur Resistenz zu erhalten, wurde versucht das PBP2b_{PCPCCO} in den Vorgängerstamm PCPCC einzubringen. Dies gestaltete sich jedoch schwierig, da es sich bei *pbp2b* um ein essentielles Gen handelt. Zunächst wurde das *pbp2b* aus PCPCCO mittels PCR amplifiziert, gereinigt und anschließend in PCPCC transformiert. Selektioniert wurde hierbei auf einer Piperacillinkonzentration von 6 µg/ml etwas oberhalb der MHK für PCPCC. Dieser Selektionsdruck sollte die Aufnahme des *pbp2b* aus PCPCCO begünstigen. Anschließend wurden zwei Transformanten ausgewählt und *pbp2b* sequenziert. Die Sequenzanalyse offenbarte, dass die *pbp2b*-Punktmutation aus PCPCCO auf PCPCC übertragen werden konnte. Die beiden neu entstanden Stämme wurden PCPCC_{PBP2b_PCPCCO_1} und PCPCC_{PBP2b_PCPCCO_2} genannt. Anschließend wurde ihre Resistenz gegen Piperacillin per Tropfentest bestimmt. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgeführt.

Es zeigte sich, dass sich bei beiden Tranformanten die MHK von 5,5 auf 7 µg/ml erhöht hatte. Die entspricht dem Resistenzniveau von PCPCCO.

Tabelle 4.11: Nachstellen der Veränderung des sechsten Selektionsschrittes - Piperacillinresistenz

Mutante	Piperacillin [µg/ml]
PCPCC	5,5
PCPCCO	7
PCPCC _{pbp2b_PCPCCO_1}	7
PCPCC _{pbp2b_PCPCCO_2}	7

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentest. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer OD₆₀₀= 0,3 herangezogen.

4. Ergebnisse

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Punktmutation in R6-Hintergrund hat. Hierzu wurde zunächst PBP2b mittels Mutageneseprimern, die die gewünschte Mutation (a1217c) enthielten, aus R6 amplifiziert, das entstandene PCR-Produkt aufgereinigt und in R6 transformiert. Die Selektion erfolgte mittels Piperacillin. Die Konzentration wurde hierbei mit 0,04 µg/ml so gewählt, dass sie minimal oberhalb der MHK für Piperacillin in R6 lag. Nach erfolgreicher Transformation wurden zwei Transformanten ausgewählt und *pbp2b* sequenziert. Beide Transformanten wiesen die gewünschte Punktmutation auf. Anschließend wurde die MHK für Piperacillin mittels Tropfentest bestimmt und die hierbei erzielten Resultate in Tabelle 4.12 aufgeführt.

Es zeigte sich, dass bei beiden Mutanten die MHK für Piperacillin durch Einbringen der Punktmutation verdoppelt werden konnte.

Tabelle 4.12: Einfluss PBP2b(Q406P) auf die Piperacillinresistenz in R6

Mutante	Piperacillin [µg/ml]
R6	0,03
R6 _{PBP2b(Q406P)_1}	0,06
R6 _{PBP2b(Q406P)_2}	0,06

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentests. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer OD₆₀₀= 0,3 angezogen.

Anschließend wurden auch die Mutanten PCPCCO bezüglich der Aktivität des CiaRH-System charakterisiert. Aufgrund der zuvor beschriebenen Instabilität der Stämme, wurde auch hier das *ciaH773*-Allel unter die Kontrolle eines Tetracyclin induzierten Promotors gestellt (PCPCCOΔ*ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773*).

Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität zeigte, dass PCPCCOΔ*ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773*, die gleiche Aktivitätsstärke wie der Vorgängerstamm, PCPCCOΔ*ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773* aufwies (Abbildung 4.41). Ein Veränderung, der durch CiaR-vermittelten Genregulation, konnte nicht verzeichnet werden.

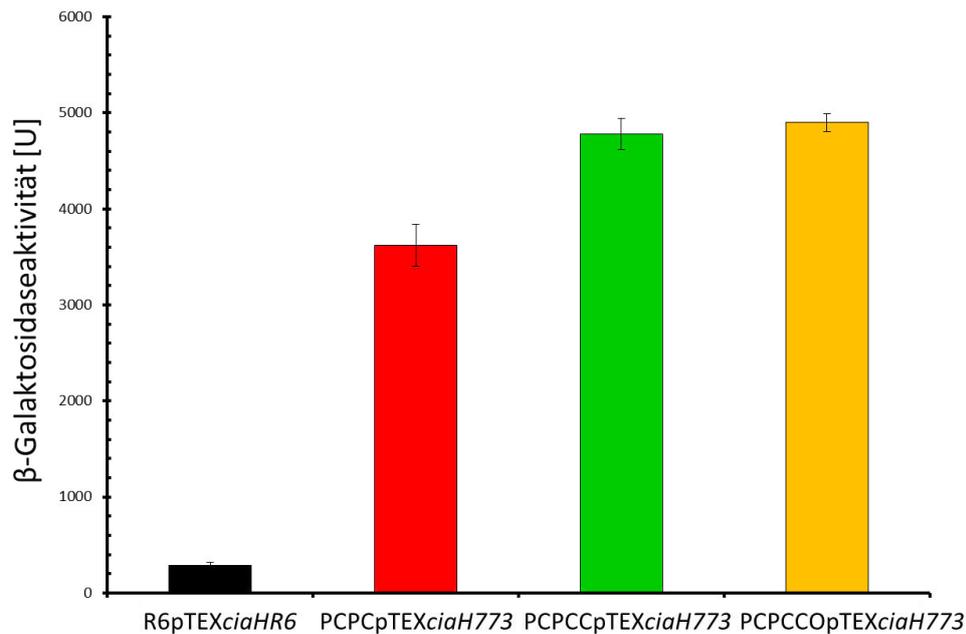


Abbildung 4.41: β-Galaktosidaseaktivität durch den CiaR-abhängigen Promotor P_{htrA} in PCPCCO Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773

Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die schwarze Säule zeigt die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β-Galaktosidaseaktivität von R6 Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaHR6, die rote, die von PCPC Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773, die grüne die von PCPC Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773, die gelbe, die von PCPCCO Δ ciaHpPP2 $_{htrA}$ pTEXciaH773. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein

Folgend wurde auch PCPCCO bezüglich des Kompetenzverhaltens untersucht. Aufgrund der bereits gezeigten starken Aktivierung des CiaRH-Systems (Abbildung 4.36) war eine stark unterdrückte Kompetenz zu erwarten. Diese Annahme konnte durch Messung der Promotorstärken der beiden Kompetenzgene *comx* und *cib* bestätigt werden (Abbildung 4.42). Es konnte nahezu keine Expression verzeichnet werden. Die Veränderung in *pbp2b* führte zu keinerlei Veränderungen des durch *ciaH773* verursachten Kompetenzblocks.

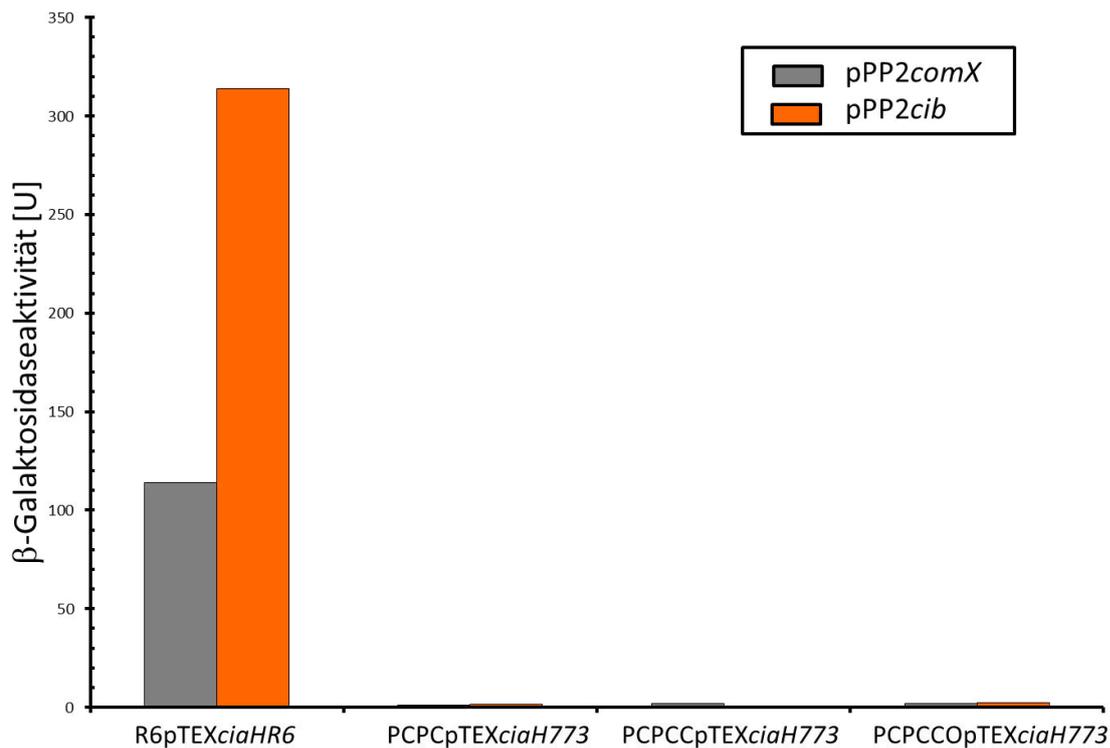


Abbildung 4.42: Aktivität der Promotoren *PcomX* und *Pcib* in *PCCCOΔciaHpTEXciaH773*

Gezeigt ist die Promotoraktivität zweier Promotoren des Kompetenzregulons in den Stämmen R6Δ*ciaHp*PP2_{htrA}pTEXciaHR6, PCPCΔ*ciaHp*PP2_{htrA}pTEXciaH773, PCPCCΔ*ciaHp*PP2_{htrA}pTEXciaH773 und PCPCOΔ*ciaHp*PP2_{htrA}pTEXciaH773. Das Wachstum der Stämme erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 im C+Y-Medium (pH 7,8). Die Anhydrotetracyclinzugabe [100 ng/ml] erfolgte vor Beginn des Wachstums. Die grauen Säulen demonstrieren die durch den Promotor *PcomX* vermittelten β-Galaktosidaseaktivitäten, die orangenen die durch *Pcip*. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

4.2.7 Steigerung des Resistenzniveaus? - Deletion der Aminoacylligase MurN

In insgesamt sechs Transformationsschritten mit chromosomaler Uo5-DNA und sukzessiver Selektion auf β-Lactamantibiotika konnte das Resistenzniveau von R6 stark erhöht werden. Die Resistenz des Donorstammes Uo5 wurde allerdings nicht erreicht. Besonders bei Piperacillin und Oxacillin lag die erreichte Resistenz deutlich unter der des Donorstammes (Tab. 4.3). Eine Übertragung von Resistenzdeterminanten von Uo5 auf R6 hatte schon ab dem dritten Selektionsschritt nicht mehr stattgefunden. Um herauszufinden, welche mögliche Uo5-Resistenzdeterminante eventuell zu einer Erhöhung des Resistenzniveaus führen könnte, wurden die Genome beider Stämme verglichen und gezielt nach Unterschieden gesucht. Hierbei fiel auf, dass Uo5 kein *murN*-Homolog besitzt (Hoskins *et al.*, 2001; Reichmann *et al.*, 2011). *MurN* befindet sich zusammen mit *murM* in einem Operon. Die durch sie codierten Enzyme sind für die Bildung der Interpeptidbrücke verantwortlich und liefern somit das Substrat für die Transpeptidasereaktion der PBPs. Die Interpeptidbrücke besteht bei *S. pneumoniae* entweder aus zwei L-Alanin-Molekülen oder aus L-Serin und L-Alanin (Garcia-Bustos

4. Ergebnisse

et al., 1987). Die Bindung der ersten Aminosäure wird hierbei durch MurM katalysiert, für die Verknüpfung der zweiten ist MurN verantwortlich. In *S. oralis* scheint die Interpeptidbrücke nur aus einer Aminosäure, L-Alanin, zu bestehen (Todorova *et al.*, 2015). Ob und wenn ja, in welchem Maße diese verkürzte Interpeptidbrücke Einfluss auf die Resistenz hat ist unklar. Um zu klären, wie sich eine verkürzte Interpeptidbrücke auf das Resistenzniveau von R6 auswirkt, wurde *murN* mittels einer Erythromycinresistenzkassette ausgeschaltet. Neben dem Wildtyp R6, wurde dieser Deletion auch in PCP durchgeführt. Der Grund hierfür war, dass PCP drei PBPs besitzt, die Uo5-Sequenz aufweisen. Es ist zu vermuten, dass diese PBPs, an das in Uo5 vorliegende Verknüpfungsmuster angepasst sind und erst im passenden Hintergrund ihr vollständiges Resistenzpotential entfalten können.

Die Bestimmung der MHK offenbarte allerdings, dass keine gesteigerte Resistenz gegen Cefotaxim durch die Deletion von *murN* erreicht werden konnte. Im Gegenteil, in beiden Stämmen, R6 und PCP sank das Resistenzniveau. Besonders stark war der Resistenzabfall in PCP zu verzeichnen. Hier war eine mehr als dreifache Reduktion der Resistenz gegenüber Cefotaxim zu verzeichnen (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Cefotaximresistenz in Abhängigkeit von *murN*

Mutante	Cefotaxim [$\mu\text{g/ml}$]
R6	0,015
R6 Δ <i>murN</i>	0,01
PCP	1,5
PCP Δ <i>murN</i>	0,4

Die annäherungsweise Bestimmung der MHK erfolgte mittels Tropfentest. Alle Stämme wurden in C+Y-Medium (pH 7,8) bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ herangezogen

5. Diskussion

5.1 Die Glycosyltransferase CpoA

Bei der Entwicklung von Resistenzen handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Prozess. Um eine solche Resistenzentwicklung Schritt für Schritt nachvollziehen und einzelne Mutationen identifizieren zu können, wurde eine Serie von unabhängigen Mutantenfamilien erstellt, die auf schrittweise erhöhter β -Lactamkonzentration selektioniert wurden (Laible und Hakenbeck, 1987). Für die Selektion wurden zwei unterschiedliche β -Lactamantibiotika verwendet, Piperacillin und Cefotaxim. Während Piperacillin mit PBP2b interagiert und eine rasche Zelllyse einleitet, zeigt Cefotaxim keine Interaktion mit diesem PBP und führt zu einer langsameren Abnahme der Lebendkeimzahl, ein Zustand, den man als Toleranz bezeichnet. In bis zu sechs Selektionsschritten entstanden so mehrere unabhängige Labormutantenfamilien, deren Familienmitglieder sich durch eine sukzessiv ansteigende Resistenz auszeichnen.

Die Resistenzentwicklung gegen β -Lactame in Pneumokokken erfordert für gewöhnlich die Änderung der Targetproteine, den PBPs. Interessanterweise ging in zwei Piperacillin-resistenten Mutantenfamilien die Resistenzentwicklung im ersten Selektionsschritt nicht mit Veränderungen der PBPs, sondern mit Mutationen in der Glycosyltransferase CpoA einher (Grebe *et al.*, 1997).

Im Folgenden werden diese CpoA-Veränderungen im Detail besprochen, ihre Auswirkungen auf die Membranzusammensetzung sowie die phänotypischen Konsequenzen für die Mutanten diskutiert.

5.1.1 Die *cpoA*-Veränderungen und die Folgen für die Glycolipidsynthese

Die Glycosyltransferase CpoA wurde als Resistenzdeterminante in zwei Piperacillin-resistenten Labormutantenfamilien im ersten Selektionsschritt entdeckt (Grebe *et al.*, 1997).

Berg *et al.* und Edman *et al.*, beschrieben CpoA biochemisch als α -Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin-Synthase, die einen Galactosylrest von UDP-Galaktose auf GlcDAG überträgt (Berg *et al.*, 2001; Edman *et al.*, 2003) und so GalGlcDAG, das Hauptglycolipid der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* bildet. Durch Detektion der Glycolipide in R6, P104, P106 und R6 Δ *cpoA* konnten diese *in vitro* Daten auch *in vivo* bestätigt werden. Keine der *cpoA*-Mutanten wies eine detektierte Menge an GalGlcDAG auf (4.1.2.1.1).

Durch exakte Bestimmung des Translationsstarts von CpoA konnte die Lage der Punktmutationen in P104 und P106, sowie die dadurch resultierenden Konsequenzen konkretisiert werden. Es konnte klar gezeigt werden, dass es sich bei ATG₁ um den Translationsstartpunkt handelt und das *cpoA* Transkript demnach leaderless ist (4.1.1). Die Anzahl an identifizierten leaderless Genen, denen das Hauptinitiationssignal der bakteriellen Translation, die Ribosomen-Bindestelle (Shine-Dalgarno) fehlt, ist in den letzten Jahren stark angestiegen (Zheng *et al.*, 2011; Scharff *et al.*, 2011). Der genaue Mechanismus, wie die leaderless Translationsinitiation abläuft ist nicht bekannt. Laut Scharff *et al.*, scheint die Struktur, oder genauer gesagt, die Strukturlosigkeit der mRNA einen entscheidenden Beitrag zu leisten. Durch ihre Untersuchung von mehreren zehntausend Gensequenzen fanden sie heraus, dass die mRNA bei Genen ohne Ribosomenbindestelle um das Startkodon herum kaum gefaltete Strukturen aufweist und sich so von der „gewöhnlicher“ Gene unterscheidet. Die Translationsinitiation scheint bei leaderless Transkripten demnach auch ohne Shine-Dalgarno Sequenz möglich, da das Startkodon besonders gut zugänglich ist und so leichter vom Ribosom erkannt werden kann (Scharff *et al.*, 2011).

Weder in P104, noch in P106 konnte eine detektierbare Menge an GalGlcDAG nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass keine der beiden Labormutanten ein funktionelles CpoA besitzt. Im Falle von P106 ist dies leicht nachvollziehbar. Durch Verschiebung des Translationsstarts ereignete sich die Deletion nicht, wie von Grebe *et al.* (1997) vermutet 15 bp upstream des zuvor vermuteten Starts (ATG₂), sondern innerhalb des fünften Codons und resultiert in einem Frameshift, der zur Produktion eines Nonsense Proteins führt. Dies deckt sich mit von Grebe *et al.* (1997) beobachteten Scheiterns einer Detektion von CpoA mittels polyklonaler Antikörper in P106. Im Zuge dieser Westernblotanalysen konnte allerdings auch gezeigt werden, dass P104 die gleiche Proteinmenge wie der Parentalstamm R6 aufweist (Grebe *et al.*, 1997). Die Frage, warum P104 kein funktionelles CpoA besitzt ist nicht einfach zu beantworten. Durch die Verschiebung des Translationsstartes kam es auch hier zu einer Änderung der Mutationsposition. Der Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin ereignete sich nicht, wie zuvor angenommen, an Position 12, sondern an Position 21. Glycosyltransferasen der GT1-YggM-like-Familie, denen auch CpoA angehört, sind über einen zweistufigen Prozess, bei dem elektrostatische Anziehungskräfte und hydrophobe Interaktionen beteiligt sind, an der Cytoplasmamembran gebunden, aber nicht in die Membran integriert (Li *et al.*, 2003). Aufgrund der Lage von G21V am N-Terminus wurde vermutet, dass der Funktionsverlust der Glycosyltransferase auf eine nicht mehr vorhandene Membranverankerung zurück zu führen sei. Diese Annahme konnte allerdings durch Nachweis von CpoA innerhalb der Membranfraktion von P104 widerlegt werden (4.1.4). Demnach beeinflusst die Punktmutation in P104 entweder die Faltung der Glycosyltransferase oder die enzymatische Aktivität. Strukturvorhersagen zeigen, dass der Austausch eines Glycins, welches aufgrund seiner häufig vorkommenden cis-Amidbindung als

Helixbrecher fungiert, zu einem Valin, zu einer Verlängerung einer α -Helix um drei Aminosäuren führt. Wie genau diese topologischen Veränderungen zum Funktionsverlust von CpoA in P104 beitragen bleibt unklar.

In einer kürzlich erschienen Studie konnte eine weitere Punktmutation in CpoA in einer auf Cefotaxim selektionierten Labormutante identifiziert werden (Fani *et al.*, 2013). Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Tyrosin an Position 186 [Aufgrund der fehlerhaften Annotation von *cpoA* im R6-Genom (Hoskins *et al.*, 2001) bei Fani *et al.* (2013) als D213Y beschrieben]. Ob und wenn ja, auf welche Weise diese Punktmutation die Aktivität der Glycosyltransferase beeinflusst, bleibt zu klären.

5.1.2 Die Verschiebung des Lipidpools und die Auswirkungen auf die Cytoplasmamembran

Neben der Abwesenheit von GalGlcDAG konnte bei allen *cpoA*-Mutanten eine Änderung des Phospholipidverhältnisses beobachtet werden (4.1.2.1.2). Während Cardiolipin das Hauptphospholipid im Parentalstamm R6 ist, weisen alle *cpoA*-Mutanten eine gesteigerte Menge an Phosphatidylglycerin auf. Diese Verschiebung des Phospholipidverhältnisses in Folge einer Glycolipiddeletion lässt auf eine Regulation der Mono- zu Bilayer formenden Lipide schließen. Studien zeigen, dass sich Glyco- und Phospholipide in wässriger Umgebung nicht automatisch zu Bilayern formieren, vielmehr entscheidet die Größe der polaren Kopfgruppe im Vergleich zum hydrophoben Acylglycerin Rückgrat, über ihr Verhalten in wässriger Lösung (Gorter and Grendel, 1925). GlcDAG neigt ebenso wie Cardiolipin dazu Monolayer zu bilden, während GalGlcDAG und Phosphatidylglycerin den Bilayer formenden Lipiden angehören. Die Aufrechterhaltung eines spezifischen Mono- zu Bilayer Verhältnis ist von enormer Bedeutung für biologische Membranen. Somit wird nicht nur eine hohe Stabilität garantiert, sondern durch den Einbau einer bestimmten Menge an Monolayer formenden Lipidkomponenten eine gewisse Flexibilität aufrechterhalten.

In Prokaryonten ist die Synthese von Phospho- und Glycolipiden eng miteinander verbunden. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei Phosphatidylglycerin zu, das einer raschen Umsetzung in der Zelle unterliegt. So werden zum einen zwei Phosphatidylglycerinmoleküle zu Cardiolipin verknüpft, zum anderen bildet Phosphatidylglycerin durch seine Umwandlung in Diacylglycerin die Vorstufe der beiden Glycolipide (Zhang und Rock, 2008). Es ist denkbar, dass in den *cpoA*-Mutanten aufgrund des Verlustes des Bilayer formenden GalGlcDAG ein Ungleichgewicht der Mono- zu Bilayerformenden Lipide vorliegt und dieses Missverhältnis durch eine Verschiebung des Phospholipidverhältnisses zugunsten des Bilayer-formenden Phospholipids (Phosphatidylglycerin) ausgeglichen wird.

Eine Regulation der Membranlipide wurde bereits bei dem zellwandlosen Bakterium *Acheloplasma laidlawii* beobachtet. *A. laidlawii* besitzt wie *S. pneumoniae* zwei Glycosyltransferasen, die Homologe zu CpoA und Spr0982 darstellen. Sie sind für die Synthese der beiden Hauptglycolipide GlcDAG und GlcGlcDAG verantwortlich. Das Verhältnis der beiden Glycolipide ist in *A. laidlawii* streng reguliert. So konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Umgebungstemperatur das Verhältnis von GlcDAG : GlcGlcDAG zu Gunsten des Bilayer-formenden Glycolipides verschiebt und somit die Membranstabilität auch bei erhöhten Temperaturen aufrecht hält. Bei niedrigen Temperaturen wird durch eine erhöhte GlcDAG-Menge die Membranfluidität bewahrt (Wieslander *et al.*, 1986).

Neben dem Glycolipidverhältnis, sind auch die Phospholipide in *A. laidlawii* stark reguliert. Als Gründe für die sich stets verändernde Membranlipidkomposition wurden die Aufrechterhaltung eines optimalen Monolayer zu Bilayer-Verhältnisses (Lindblom *et al.*, 1986), die Gewährleistung einer nahezu konstanten Membrankrümmung (Osterberg *et al.*, 1995), sowie eine konstante Oberflächenladung diskutiert (Christiansson *et al.*, 1985).

Weitere, interessante Aspekte hierzu konnten bei *Enterococcus faecalis* beobachtet werden. *E. faecalis* besitzt die beiden Hauptglycolipide GlcDAG und GlcGlcDAG, deren Synthese wie bei *S. pneumoniae* durch zwei Glycosyltransferasen erfolgt. BgsB ist für die Synthese des ersten (GlcDAG), BgsA für die Synthese des zweiten Glycolipids (GlcGlcDAG) zuständig. Ein Knockout von BgsA führt in *E. faecalis* zum Verlust von GlcGlcDAG und zu einer Anhäufung von GlcDAG (Theilacker *et al.*, 2009). Kürzlich durchgeführte Proteomanalysen offenbarten, dass die Δ bgsA-Mutante eine gesteigerte Expression von Lipoproteinen aufweist. Während der Lipoproteingehalt der Cytoplasmamembran des Wildtyps bei 9,4 % liegt, erhöht sich dieser innerhalb der Mutante auf 35,8 % (Theilacker *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass auch dies ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Membranhomostasis darstellt. Lipoproteine besitzen ebenso wie GlcGlcDAG eine große polare Kopfgruppe und könnten somit als potentielle Bilayer-formende Amphiphile in der Membran fungieren (Theilacker *et al.*, 2015).

Eine Crossregulation der Membranlipide konnte ebenfalls bei *Bacillus subtilis* Mutanten beobachtet werden, die einen Defekt in der Cardiolipinsynthese aufweisen. Lopez *et al.* fanden heraus, dass sich die Abwesenheit von Cardiolipin in der Cytoplasmamembran auch auf andere Membrankomponenten, wie Fettsäuren und Glycolipide auswirkt (Lopez *et al.*, 2006). Mutationen in dem Gen, das für die Cardiolipinsynthese codiert konnten in einer kürzlich erschienen Studie in einer cefotaximresistenten Labormutante von *S. pneumoniae* beobachtet werden (Fani *et al.*, 2013). Ob sich diese Mutation auf Membranlipidkomposition der Mutante auswirkt bleibt zu klären.

Die Verteilung der Glycolipide innerhalb der Membran wirkt sich auf die Krümmung des Bilayers, die Oberflächenladung, sowie andere membranassoziierte Prozesse aus (Shaw, 1970). Auch eine

Beteiligung an der Virulenz konnte nachgewiesen werden. So weisen die $\Delta bgsA$ und $\Delta bgsB$ Mutanten von *E. faecalis* eine reduzierte Biofilmbildung, sowie eine verminderte Virulenz im Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp auf (Theilacker *et al.*, 2011). Neben den Glycolipiden wird die Morphologie und Krümmung der Cytoplasmamembran auch von Membranproteinen beeinflusst (Campelo *et al.*, 2008). Die Daten von Wikström *et al.*, deuten stark darauf hin, dass auch Glycosyltransferasen selbst Einfluss auf die Membrankrümmung nehmen können (Wikström *et al.*, 2009). Dies lässt auf mögliche Konsequenzen schließen, wenn CpoA, so wie im Fall von P106 und R6 $\Delta cpoA$, abwesend ist. Änderungen bezüglich des Phänotyps im Vergleich zu P104, welche die gleiche CpoA-Menge wie R6 aufweist, konnten allerdings im Zuge dieser Arbeit nicht beobachtet werden (4.1.2). Alle *cpoA*-Mutanten weisen den gleichen pleiotropen Phänotyp auf.

5.1.3 Der pleiotrope Phänotyp der *cpoA*-Mutanten

Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten *cpoA*-Mutanten besitzen ein verändertes Membranlipidprofil. In keiner der Mutanten konnte das Hauptglycolipid von *S. pneumoniae*, GalGlcDAG, nachgewiesen werden. Eine der Hauptinteressen dieser Arbeit bestand darin herauszufinden, mit welchen phänotypischen Konsequenzen dieses veränderte Lipidverhältnis verbunden ist.

Erste phänotypische Untersuchungen fanden bereits im Zuge früherer Arbeit statt. Hierbei konnte neben einer verminderten PBP1a-Menge, ein Kompetenzdefekt, sowie eine vierfache Erhöhung der Piperacillinresistenz beobachtet werden (Grebe *et al.* 1997; Volz, 2008; Meiers, 2011). In dieser Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen bezüglich des Phänotyps der *cpoA*-Mutanten durchgeführt. Durch Transformationseffizienztestung konnte der Kompetenzdefekt, der bereits von Grebe *et al.* (1997) beschrieben wurde, untermauert werden. Es zeigte sich, dass die Transformationseffizienz bei den *cpoA*-Mutanten deutlich unterhalb von R6 liegt. Während der Wildtyp über die komplette exponentielle Phase hinweg kompetent ist, so weisen sie nur in der frühen exponentiellen Phase einen Kompetenzpeak auf. Die Transformationseffizienzen der *cpoA*-Mutanten konnten bei keiner Zelldichte den Wert des Parentalstammes R6 erreichen und lagen mindestens zwei Zehnerpotenzen darunter.

Neben dem Verlust der natürlichen Transformierbarkeit, weisen die *cpoA*-Mutanten eine erhöhte Generationszeit, eine verminderte Säureempfindlichkeit, eine verzögerte Triton-induzierte Lyse, sowie eine reduzierte Bacitracinresistenz auf. Die beobachteten Phänotypen legen nahe, dass sich in den *cpoA*-Mutanten neben der Verschiebung des Membranlipidverhältnisses auch Änderungen der Zellwand ereignet haben könnten.

Denkbar wäre, dass die Änderung der Lipidkomposition der Cytoplasmamembran in einer Änderung der Oberflächennettoladung resultiert. Eine Verschiebung der Ladungsverhältnisse könnte unter anderen auf die Änderung des Phospholipidverhältnisses zurückzuführen sein. Bei allen *cpoA*-Mutanten verschob sich das Verhältnis zugunsten von Phosphatidylglycerin, das im Gegensatz zu Cardiolipin nicht zwei, sondern lediglich eine negative Nettoladungen aufweist.

Eine Änderung des Phospholipidgehaltes scheint auch an der Daptomycinresistenz von Enterokokken beteiligt zu sein. So weisen die daptomycinresistenten Mutanten eine erhöhte positive Nettoladung auf, die wahrscheinlich durch Änderung des Phospholipidgehalts hervorgerufen wird und die Interaktion des ebenfalls positiv geladenen Antibiotikum mit der Zelloberfläche erschwert (Mishra *et al.*, 2012).

Veränderungen der Oberflächenladung sind auch bei der Resistenz gegenüber Bakteriocinen beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass die Veresterung der Teichonsäure mit D-Alanin eine Verminderung der negativen Nettoladung der Zellwand bewirkt (Fischer, 1988). Einen entscheidenden Beitrag hierzu liefert das *dltA*-Operon, welches für Proteine codiert, die den Einbau von D-Alanin in WTA und LTA bewerkstelligen (Peschel *et al.*, 1999). Peschel *et al.*, konnten zeigen, dass Mutationen im *dltA* Gen zum Verlust des Alanineinbaus und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Bakteriocinen in *Staphylococcus aureus* führen. Zurückgeführt wird dieser Resistenzverlust auf eine erhöhte negative Oberflächenladung und daraus resultierend eine erhöhte Interaktion der Bakteriocine mit der bakteriellen Oberfläche (Peschel *et al.*, 1999). Die Beteiligung des *dlt*-Operons bei der Resistenz gegenüber Bakteriocinen und anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden scheint ein generelles Phänomen unter den Gram-positiven Bakterien zu sein und wurde neben *S. aureus* auch bei *Clostridium difficile* und *B. cereus* nachgewiesen (McBride und Sonenshein, 2011; Abi Khattar *et al.*, 2009). Ein weiterer Mechanismus der Bakteriocinresistenz bei *S. aureus* ist die Modifikation der Phospholipide mit Lysin. Das dabei entstehende Lysylphosphatidylglycerin führt ebenfalls zu einem Herabsetzen der Negativladung der Bakterienmembran (Peschel *et al.*, 2001).

Aufgrund einer Punktmutation im *dltA*-Gen besitzt R6 kein D-Alanin in der Zellwand (Draing *et al.*, 2006; Kovács *et al.*, 2006). Auch hier konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden (Kovács *et al.*, 2006).

Der pleiotrope Phänotyp der *cpoA*-Mutanten könnte auch ein Hinweis auf Veränderungen der LTA oder der LTA-Menge sein. Zu den Funktionen der LTA gehören neben der Bindung von divalenten Kationen wie Mg^{2+} und Oberflächenproteinen, auch Zellwand-assoziierte Prozesse, wie die Kompetenz und die Autolyse (Hughes *et al.*, 1973; Lambert *et al.*, 1975; Briese und Hakenbeck, 1985; Tomasz, 1968; Zhang *et al.*, 1999; Wecke *et al.*, 1997). In all diesen Prozessen weisen die *cpoA*-

Mutanten deutliche Unterschiede im Vergleich zum Parentalstamm R6 auf. Gegen die Theorie einer veränderten LTA spricht allerdings der Lipidanker von *S. pneumoniae*. Während bei den meisten Gram-positiven Bakterien, darunter *S. aureus* und *B. subtilis*, das zweite Glycolipid (GlcGlcDAG bzw. GlaGlcDAG) als Lipidanker für die LTA fungiert (Jorasch *et al.*, 1998, Jorasch *et al.*, 2000; Kiriukhin *et al.*, 2001), stellt GlcDAG den Lipidanker für die LTA in Pneumokokken (Seo *et al.*, 2008). Demnach bleibt in den *cpoA*-Mutanten trotz Verlust von GalGlcDAG der Lipidanker erhalten. Das Gen, das für die Glycosyltransferase Spr0982 codiert, die einen Glycosylrest an DAG anhängt und somit für die Synthese des Lipidankers verantwortlich ist, ist essentiell in Pneumokokken (Song *et al.*, 2005). Während in anderen Gram-positiven Bakterien eine Verschiebung des Lipidankers von GlcGlcDAG auf DAG möglich ist, scheint in *S. pneumoniae* ausschließlich GlcDAG als Lipidanker der LTA zu fungieren. Möglich, dass die komplexe LTA-Struktur in Pneumokokken eine direkte Bindung an DAG verhindert. Denkbar wäre hingegen eine, wie bereits von Volz (2008) vermutete, eine limitierende Funktion von CpoA auf die verfügbaren Lipidanker. Demnach stünden den *cpoA*-Mutanten mehr freie Lipidanker für die LTA-Biosynthese zur Verfügung, die entsprechend in einer erhöhten LTA-Menge, bzw. in einer Verschiebung des LTA:WTA-Verhältnisses resultieren könnten. Hinweise darauf, dass es sich bei GlcDAG um das limitierende Element in der LTA-Synthese handelt, gibt es allerdings nicht. Auch waren in den durchgeführten Transkriptomanalysen keine Anhaltspunkte auf Veränderungen der Expression der an der LTA-Synthese beteiligten Gene zu finden (4.1.5). Eine Erhöhung der GlcDAG-Menge in den *cpoA*-Mutanten konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (4.1.2.1.1).

Die Untersuchung der Transkriptionsprofile der *cpoA*-Mutanten zeigte, dass vor allem Membranproteine, wie PTS-Systeme und ABC-Transporter, eine unterschiedliche Expressionsstärke im Vergleich zum Wildtyp R6 aufwiesen (4.1.5). Die Darstellung der Membranproteine über die SDS-Gelelektrophorese offenbarte allerdings keine signifikanten Unterschiede (4.1.5.2). Dies könnte auf die Fülle an Membranproteinen und der teilweisen Überlagerung auf dem SDS-Gel zurückzuführen sein. Eine stärkere Auftrennung der Membranproteine zum Beispiel über 2D-Gelelektrophorese könnte hier Aufschluss liefern.

Innerhalb der Transkriptomanalysen zeigten die Gene des *vex*-Clusters (*spr0524-spr0526*) in allen *cpoA*-Mutanten eine erhöhte Transkriptmenge auf. Die Gene codieren für einen ABC-Transporter und wurden bereits mit Antibiotikaresistenz in *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht. So tauchte *spr0525* (*vex2*) auf einer Liste von veränderten Genen auf, die im Verdacht stehen an der Linezolid-Resistenz beteiligt zu sein (Feng *et al.*, 2009) und das Gen *spr0526* (*vex3*) wurde als mögliche Resistenzdeterminante einer cefotaximresistenten Labormutante identifiziert (Fani *et al.*, 2013). Des Weiteren war das *vex*-Cluster Gegenstand einer Debatte zur Vancomycintoleranz in Pneumokokken. So wurde von Novak *et al.*, ein Beitrag des *vex123-pep₂₇-vncRS Locus* an der Vancomycintoleranz von

Pneumokokken postuliert (Novak *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2000). Bei VncRS handelt es um ein Zweikomponentensystem, das aus der Histidinkinase VncS und den Responseregulator VncR besteht. Es wurde vermutet, dass das Peptid Pep27, welches durch den Vex-ABC-Transporter sekretiert wird, von VncS als Signal wahrgenommen wird. Reichert sich Pep27 in der stationären Phase oder bei Antibiotikabehandlung im Medium an, so wandelt sich die Kinase zu einer Phosphatase, die den phosphorylierten Responseregulator VncR dephosphoryliert. In Folge dieser Dephosphorylierung geht die Repression des autokatalytischen Pathways verloren und resultiert schließlich in der Lyse der Pneumokokken. Diese Vermutung führte zur Bezeichnung von Pep27 als „Todespeptid“. Es wurde angenommen, dass Mutationen innerhalb des *vex123-pep27-vncRS Locus* aufgrund des Verlustes der VncS-Pep27-Interaktion zur Vancomycintoleranz führen (Novac *et al.*, 1999; Novac *et al.*, 2000). Diese Annahmen konnten von Robertson *et al.*, widerlegt werden. Sie konnten zeigen, dass die, von Novac *et al.* beobachtete Vancomycintoleranz nicht auf einem Verlust der VncS Funktion, sondern auf die Zugabe von subinhibitorischen Erythromycinkonzentrationen, aufgrund des verwendeten Erythromycinmarkers, im Wachstumsmedium zurück zu führen ist. Des Weiteren fanden sie heraus, dass eine synthetische Form des „Todespeptides“ Pep27 nicht die Lyse von Pneumokokken einleitet (Robertson *et al.*, 2002). In einer 2004 durchgeführten Studie von Haas *et al.*, konnte dies nochmal bestätigt werden. Allerdings konnten sie auch aufzeigen, dass die erhöhte Vancomycinresistenz der *vex3*-Mutanten nicht durch einen polaren Effekt der *ermB*-Kassette vermittelt wird (Haas *et al.*, 2004). Ein Unterschied in der Vancomycinresistenz konnte bei den *cpoA*-Mutanten, trotz der bis zu achtfach erhöhten Transkriptmenge des *vex*-Clusters, im Vergleich zum Wildtyp R6 nicht beobachtet werden (Meiers *et al.*, 2014).

Innerhalb der Transkriptomanalyse wurde auch für das *ytrA*-Cluster eine signifikant erhöhte Transkriptmenge in allen *cpoA*-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm R6 beobachtet. Dieses Cluster setzt sich in *S. pneumoniae* R6 aus drei Genen zusammen (*spr1558*, *spr1559*, *spr1560*), die eventuell eine Transkripteinheit bilden und durch den, von *spr1558* kodierten putativen transkriptionellen Regulator kontrolliert werden. Innerhalb der Gruppe der Streptokokken wurde dieses Cluster funktionell nicht charakterisiert, ist aber hoch konserviert. Laut Peterson *et al.*, gehört es dem Kompetenzregulon von *S. pneumoniae* an (Peterson *et al.*, 2004).

Das *ytrA*-Cluster tauchte bereits innerhalb von Volz (2008) durchgeführten Mikroarray-Analysen auf, in denen die Transkriptmenge der Mutanten P106, R6 Δ *cpoA*, P306 und P506 mit denen des Parentalstammes R6 verglichen wurden. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, wurden die zur Transkriptomanalyse verwendeten Stämme unter kompetenzinduzierenden Bedingungen, im C+Y-Medium (pH 7,8), herangezogen. Aufgrund der bis zu fünffach erhöhten Transkriptmenge wurde eine Beteiligung des *ytrA*-Clusters an den bisher unbekanntem Resistenzmechanismen in P406 und P506

(4.1) vermutet. Die mittels einer *tetM*-Kassette hergestellten Deletionsmutanten P406 Δ *ytrA* und P506 Δ *ytrA* wiesen allerdings keine veränderte MHK gegenüber Piperacillin auf (Volz, 2008).

Auffällig war, dass in den durchgeführten Transkriptomanalysen, vor allem Membranproteine, wie PTS-Systeme und ABC-Transporter, eine unterschiedliche Expressionsstärke im Vergleich zum Parentalstamm R6 aufzeigten. Im Zuge früher Studien wurde bereits der Einfluss, der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran auf die Enzymaktivität, sowie die Membranverankerung membranassoziierter Proteine diskutiert (Yeagle, 1989; Escriba *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Membranlipidkomposition Einfluss auf die Proteinstruktur, wie auch die Proteinfunktion hat (Dowhan *et al.*, 2004) und dass spezielle Lipide, sowie eine spezifische Membranlipidumgebung für die Faltung einiger Membranproteine erforderlich ist (Bogdanov *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Möglich, dass die Lipidzusammensetzung der Membran auch Quorum-Sensing-Systeme wie das Kompetenzregulon beeinflusst. Der Kompetenzdefekt der *cpoA*-Mutanten könnte durch eine Beeinflussung des ABC-Transporters ComAB oder der membranständigen Histidinkinase ComD hervorgerufen werden. In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass die Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD, welche die Expression der *kdpFABC* Operon reguliert, von negativ geladenen Phospholipiden abhängig ist (Stallkamp *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass der Kompetenzdefekt der *cpoA*-Mutanten durch externe CSP-Zugabe nahezu aufgehoben werden kann, könnte auf eine Störung der CSP-Prozessierung durch ComAB hindeuten. Auch die erhöhte Bacitracin-Sensitivität der *cpoA*-Mutanten könnte auf eine Beeinflussung der Membranproteine aufgrund einer veränderten Lipidumgebung zurückzuführen sein. In einer 2008 erschienenen Studie wurde ein ABC-Transporter identifiziert, der mit der Bacitracinresistenz in Pneumokokken in Verbindung steht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Knockout, wie auch eine Nonsense-Mutation zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Peptidantibiotikum in *S. pneumoniae* führt (Becker *et al.*, 2008). Denkbar wäre, dass die erhöhte Bacitracinsensitivität der *cpoA*-Mutanten auf eine Aktivitätsänderung dieses Transporters aufgrund einer veränderten Membranlipidumgebung zurück zu führen ist.

5.2 Die Analyse β -Lactamresistenter Pneumokokken

5.2.1 Die Grenzen des horizontalen Gentransfers

Die im Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit stehenden Mutanten PCPC, PCPC und PCPCCO entstammen einer Transformationsstudie zur Untersuchung des horizontalen Gentransfers zwischen *S. pneumoniae* und *S. oralis*. Hierzu wurde das sensitive Pneumokokken Isolat R6 mit chromosomaler DNA des hochresistenten *S. oralis* Uo5 transformiert und auf sukzessiv steigender β -Lactamkonzentration selektioniert. Es entstanden sechs Transformanten, die sich durch eine stufenweise erhöhte Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika auszeichnen. Das Resistenzniveau des Donorstammes Uo5 konnte nicht vollständig auf R6 übertragen werden (4.2.1).

Die Genomsequenzierung der Stämme PCP und PCPCCO offenbarte, dass nach dem dritten Selektionsschritt keine Uo5-DNA mehr auf *S. pneumoniae* R6 übertragen wurde. Während der Resistenzanstieg in den ersten drei Transformanten vor allem durch die Übertragung niederaffiner PBPs (PBP2x, PBP1a und PBP2b) des hochresistenten *S. oralis* Uo5 vermittelt wurde, so wurde die Steigerung des Resistenzniveau in den letzten drei Selektionsschritten einzig durch Punktmutationen erreicht. Ein Mechanismus, der bereits aus Labormutanten bekannt ist. Horizontaler Gentransfer hat in den letzten drei Selektionsschritten, trotz Zugabe von Uo5-DNA nicht mehr stattgefunden. Die Abbildung 5.1 gibt einen Überblick über die Veränderungen, die in den sechs Mutanten identifiziert werden konnten.

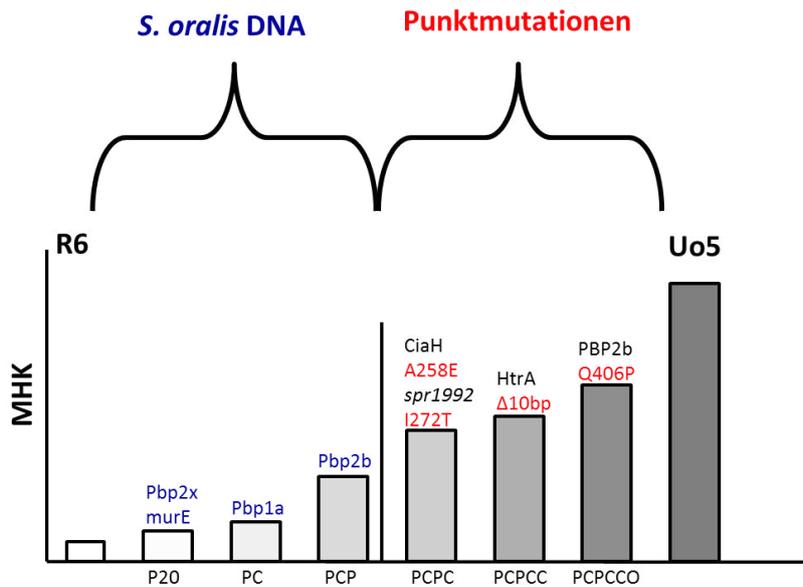


Abbildung 5.1: Resistenzdeterminanten von P20, PC, PCP, PCPC, PCPCC und PCPCCO

Schematische Darstellung der im Zuge des horizontalen Gentransfers zwischen *S. oralis* Uo5 und *S. pneumoniae* R6 generierte Mutanten. Die Bezeichnung der Stämme erfolgte in der Reihenfolge der verwendeten Selektionsantibiotika (P: Piperacillin, C: Cefotaxim, O: Oxacillin). In den ersten drei Selektionsstufen wurde der Resistenzanstieg durch die Übertragung von Uo5-Genen vermittelt (blau markiert), während für die Resistenzentwicklung in Selektionsschritt vier, fünf und sechs allein Punktmutationen (rot markiert) verantwortlich sind. Die Veränderungen der letzten drei Selektionsstufen wurden im Zuge dieser Arbeit identifiziert, die Austausch in P20, PC und PCP sind bereits von Todorova *et al.*, (2015) beschrieben.

Der horizontale Gentransfer von kommensalen Streptokokken auf *S. pneumoniae* war bereits Thema früherer Studien. Der sensitive *S. pneumoniae* R6 wurde mit chromosomaler DNA eines hochresistenten *S. mitis*-Isolat (*S. mitis* B6) transformiert. In vier Selektionsschritten auf sukzessiv gesteigerter β -Lactamkonzentration konnte nahezu das gesamte Resistenzniveau auf R6 übertragen werden. Vermittelt wurde dieser Resistenzanstieg durch den Transfer niederaffiner PBPs (Hakenbeck *et al.*, 1998; Sauerbier *et al.*, 2012).

Die Übertragung der gesamten Resistenz war im Falle von Uo5 auf R6 nicht möglich. Das Resistenzniveau des sensitiven R6 konnte zwar gesteigert werden, blieb aber deutlich unterhalb des Uo5-Niveaus (4.2.1). Die Frage, warum ab dem dritten Selektionsschritt kein horizontaler Gentransfer mehr stattgefunden hat, ist nicht trivial zu beantworten. Klar ist, dass die Punktmutation in *ciaH*, welche sich im vierten Selektionsschritt ereignete, zu einem Kompetenzblock führte und eine Transformation von PCPC und PCPCC nahezu unmöglich machte (4.2.3). Dies erklärt aber nicht, warum nach dem dritten Selektionsschritt keine Resistenzdeterminanten mehr übertragen wurden. Die Transformationseffizienz von PCP lag zwar eine Zehnerpotenz unterhalb der von R6, zeigte aber dennoch Transformationspotential. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Transformanten, die ebenfalls im vierten Selektionsschritt zusammen mit PCPC generiert wurden, weitere Uo5-

Resistenzdeterminanten enthielten. Aufgrund der niedrigen Transformationseffizienz (Todorova, 2010), ist es allerdings wahrscheinlicher, dass die Transformanten des vierten Selektionsschrittes nur aufgrund von Punktmutationen und nicht durch Aufnahme resistenter Uo5-Gene erhalten wurden.

Eine Erklärung dafür, warum eine vollständige Resistenzübertragung auf R6 bei *S. mitis*, aber nicht bei *S. oralis* möglich war, könnte in den MLST-basierten Verwandtschaftsverhältnissen zu finden sein (Chi *et al.*, 2007). Demnach ist *S. mitis* sehr nahe mit *S. pneumoniae* verwandt, während *S. oralis* nur einen entfernten Verwandten von *S. pneumoniae* darstellt. Denapaité *et al.* gehen sogar davon aus, dass es sich bei *S. pneumoniae* um einen Klon von *S. mitis* handelt (Denapaité *et al.*, 2010). Dies lässt vermuten, dass die Übertragung weiterer Resistenzdeterminanten von Uo5 auf R6 aufgrund zu großer Sequenzunterschiede scheiterte und die Möglichkeit zur homologen Rekombination weiterer Resistenzdeterminanten nicht gegeben war.

Bei Vergleich der Genome von Uo5 und R6 fällt auf, dass *S. oralis* kein *murN*-Homolog besitzt (Hoskins *et al.*, 2001; Reichmann *et al.*, 2011). *MurN* befindet sich zusammen mit *murM* in einem Operon. Die durch sie codierten Enzyme sind für die Bildung der Interpeptidbrücke verantwortlich und liefern somit das Substrat für die Transpeptidasereaktion der PBPs. Die Interpeptidbrücke besteht bei *S. pneumoniae* entweder aus zwei L-Alanin-Molekülen oder aus L-Serin und L-Alanin (García-Bustos *et al.*, 1987). Die Bindung der ersten Aminosäure wird hierbei durch MurM katalysiert, für die Verknüpfung der zweiten Aminosäure ist MurN zuständig. In *S. oralis* scheint die Interpeptidbrücke nur aus einer Aminosäure, L-Alanin, zu bestehen (Todorova *et al.*, 2015).

MurM ist neben CiaH die einzige Nicht-PBP-Resistenzdeterminante, die in klinischen Isolaten identifiziert werden konnte. Diese resistenten *murM*-Gene besitzen eine Mosaikstruktur und treten zusammen mit niederaffinen PBPs auf (Smith und Klugman, 2001; Filipe *et al.*, 2001; Cafini *et al.*, 2006). Auch im Zuge der Untersuchungen des horizontalen Gentransfers von *S. mitis* auf *S. pneumoniae* konnte MurM als Resistenzdeterminante in Labormutanten identifiziert werden (Sauerbier *et al.*, 2012). Eine Übertragung von *murM* aus *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6 scheiterte, wahrscheinlich aufgrund zu großer Sequenzunterschiede und fehlender Rekombinationsmöglichkeiten (Frohnweiler, 2009).

In hochresistenten Pneumokokken konnte bereits gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *murM*, sowie des kompletten *murMN*-Operons zur Abnahme der verzweigten Peptide und zum Resistenzverlust, auch in Anwesenheit niederaffiner PBPs, führt (Filipe *et al.*, 2000; Filipe und Tomasz, 2000; Weber *et al.*, 2000, Sauerbier *et al.*, 2012). Die Ursache für diesen Resistenzabfall ist unklar. Eine Vermutung ist, dass die verzweigten Muropeptide ein bevorzugtes Substrat für die niederaffinen PBPs darstellen (Gracia-Bustos und Tomasz, 1990; Severin und Tomasz, 1996; Severin

et al., 1996; Zhao *et al.*, 1997; Dessen *et al.*, 2001) und in Abwesenheit dieser verzweigten Muropeptide der scheinbar bessere Gegenspieler für die β -Lactame fehlt (Filipe und Tomasz, 2000).

Während die Rolle von *murM* in der β -Lactamresistenz von Pneumokokken bekannt ist, scheint *murN* eine eher untergeordnete Bedeutung zuzukommen. Während häufig *murM*-Gene mit Mosaikstrukturen entdeckt werden, so findet man unter den *murN*-Genen nur eine geringe Varianz (Filipe *et al.*, 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das MurM aus resistenten Stämmen eine andere enzymatische Aktivität zeigt, wie in sensitiven. Für MurN konnte hingegen keine signifikanten Änderungen der Enzymaktivität beobachtet werden (Lloyd *et al.*, 2008; De Pascale *et al.*, 2008).

In den ersten drei Selektionsschritten kam es zur teilweisen bzw. vollständigen Übertragung von drei niederaffinen PBPs (PBP2x, PBP1a, PBP2b) von *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6. Da Uo5 im Gegensatz zu R6 kein MurN besitzt, könnte man annehmen, dass diese niederaffinen PBPs, die große Bereiche an Uo5-DNA aufweisen, an die Abwesenheit von MurN, und somit an eine verkürzte Interpeptidbrücke angepasst sind und nur in diesem genetischen Hintergrund ihr volles Resistenzpotential entwickeln können. Die MHK-Untersuchung zeigte allerdings, dass das Fehlen von MurN zu einem Resistenzverlust in PCP, der drei niederaffine PBPs enthält, führte. Die Resistenz gegenüber Cefotaxim sank von 1,5 auf 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Ein Abfall der Cefotaximresistenz konnte ebenfalls im Wildtyp R6 beobachtet werden. Hier reduzierte die *murN*-Deletion die MHK von 0,15 auf 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (4.2.7).

Eine Beteiligung von MurN an der β -Lactamresistenz konnte bereits bei *E. faecalis* beobachtet werden. Die Interpeptidbrücke von *E. faecalis* besteht aus zwei Alaninmolekülen, die durch die Genprodukte von *bppA1* und *bppA2* synthetisiert werden. Die Deletion von *bppA2*, das ein Homolog zu *murN* darstellt, führt zu einer verkürzten Interpeptidbrücke und reduzierte die MHK für Ceftriaxon, ein Cephalosporin der dritten Generation, um das Achtfache (Bouhss *et al.*, 2002). In *E. faecalis* wird die Ceftriaxonresistenz durch das niederaffine PBP5 vermittelt. Es wurde vermutet, dass PBP5 aufgrund des unvollständigen Peptidoglycanvorläufers nicht optimal funktioniert und so zum Resistenzverlust der *bppA2*-Mutante beiträgt (Bouhss *et al.*, 2002). Auch bei *S. pneumoniae* korreliert die Deletion von *murN* mit einer Abnahme der Resistenz. Dieser Effekt ist allerdings deutlich geringer wie im Falle der *murM*-Deletion (Filipe *et al.*, 2000). Auch die innerhalb dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von MurN an der Aufrechterhaltung der β -Lactamresistenz hin. Dieser Effekt konnte sowohl in An- wie auch in Abwesenheit niederaffiner PBPs beobachtet werden (4.2.7). Die Ursache für diesen Resistenzverlust bleibt unklar. Durch Filipe *et al.*, konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an quervernetzten Muropeptiden in der $\Delta\textit{murN}$ -Mutante eines penicillinresistenten R6-Derivates sich kaum vom Wildtyp unterscheidet, während die $\Delta\textit{murM}$ -Mutante einen deutlich reduzierten Anteil an verzweigten Muropeptiden aufweist (Filipe *et al.*,

2000). Trifft dies auch auf die hier untersuchten Stämme zu, wäre der Verlust an verzweigten Muropeptiden als Ursache für den Resistenzverlust, nahezu ausgeschlossen. Denkbar ist allerdings, dass die vollständige Interpeptidbrücke einen besseren Konkurrenten für die β -Lactamantibiotika darstellt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach dem dritten Selektionsschritt keine Übertragung von Resistenzdeterminanten von Uo5 auf R6 mehr stattgefunden hat. Der Resistenzanstieg wurde einzig über Punktmutationen bewerkstelligt. Im Folgenden werden diese Punktmutationen, sowie ihre phänotypischen Auswirkungen im Detail besprochen.

5.2.2 Die Veränderungen in den letzten drei Selektionsschritten

5.2.2.1. Die Punktmutationen in PCPC - Charakterisierung eines neuen *ciaH*-Allels und die Rolle der Veränderung in *spr1992*

Durch die Genomsequenzierung konnten zwei Punktmutationen identifiziert werden, die sich im vierten Selektionsschritt ereigneten. Eine Punktmutation in *ciaH* (c773a) und eine weitere im Gen *spr1992* (t815c), welches für ein hypothetisches Protein codiert.

Die Histidinkinase CiaH ist die erste nicht PBP-Resistenzdeterminante die in *S. pneumoniae* identifiziert werden konnte (Guenzi *et al.*, 1994).

Das in dieser Arbeit entdeckte *ciaH*-Allel (*ciaH773*) befindet sich zwischen den beiden gut charakterisierten Allelen *ciaH208* und *ciaH202* und bewirkte einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Glutamat an Position 258. Durch frühere Arbeiten ist bekannt, dass Punktmutationen innerhalb des Histidinkinasegens *ciaH* häufig eine starke Aktivierung des Responseregulators CiaR bewirken (Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b; Müller *et al.*, 2011). Durch die Punktmutationen und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche kommt es zu einer stärkeren Phosphorylierung von CiaR und folglich zu einer gesteigerten Aktivität des gesamten CiaR-Regulons.

Im Zuge dieser Arbeit stellte sich heraus, dass *ciaH773*, zu den instabilen Allelen gehört. Eine exakte Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität scheiterte in PCPC, PCPCC und PCPCCO an der hohen Zahl an Pseudorevertanten. Es traten vermehrt Zusatzmutationen auf, die die Hyperaktivität des CiaRH-Systems wieder herabsetzen (4.2.2). Das Einbringen von *ciaH773* über eine Januskonstruktion in den R6-Hintergrund scheiterte ebenfalls. Durch frühere Arbeiten war bereits bekannt, dass stark aktivierende *ciaH*-Allele oftmals zur Instabilität neigen (Müller, 2011; Laux, 2014).

Offensichtlich stellt ein hyperaktiviertes CiaRH-System ein enormes Problem für die Bakterienzelle dar. Andererseits konnte aber auch gezeigt werden, dass ein inaktives CiaRH-System in *S. pneumoniae* eine höhere Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Umweltbedingungen auslöst (Sebert *et al.*, 2002; Tsui *et al.*, 2010). Eine moderate Aktivierung des Systems scheint von großer Bedeutung für die Zelle zu sein und starkes Unter- oder Überschreiten dieses Basalniveaus die Zelle in großen Stress zu versetzen.

Hinweise darauf, wie gefährlich ein zu stark aktiviertes Zweikomponentensystem für die Bakterienzelle sein kann, wurde durch Untersuchungen bezüglich der Wirkung der PGRPs (Mammalian Peptidoglycan Recognition Proteins) erzielt. PGRPs sind Proteine des angeborenen Immunsystems, die von Insekten bis hin zu Säugetieren auftreten und als antibakteriellen Schutz fungieren. Kashyap *et al.* vermuten, dass dieser antimikrobielle Schutz, in *B. subtilis* und *E. coli* durch eine Interaktion der PGRPs mit dem Zweikomponentensystems CsrRS bzw. CpxAR vermittelt wird. Sie nehmen an, dass die Immunproteine die Zweikomponentensysteme stark aktivieren können und durch diese Hyperaktivierung des Systems Prozesse in Gang gesetzt werden, wie unter anderem die Produktion von reaktive Sauerstoffverbindungen, die schließlich zum Zelltod führen (Kashyap *et al.*, 2011; Kashyap *et al.*, 2014).

Um trotz der großen Instabilität mit den Stämmen PCPC, PCPCC und PCPCCO arbeiten zu können und das Risiko von sekundären Mutationen zu mindern, wurde die Expression von *ciaH773* unter die Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors gestellt (4.2.2.1). Dies ermöglichte es, die Stämme während der Konstruktion in einem uninduzierten Zustand, vergleichbar mit $\Delta ciaH$, zu halten und erst unmittelbar vor der Messung zu induzieren. Neben pTEX*ciaH773*, bei dem der Promotor $P_{xy/tet}$ upstream des *ciaH773*-Allels kloniert wurde, wurde noch ein zweites Plasmid konstruiert, bei dem die Expression des Wildtyps-*ciaH* unter die Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors steht (pTEX*ciaHR6*). So wurde sichergestellt, dass die beobachteten Phänotypen ausschließlich auf *ciaH773* zurückzuführen sind. Diese Konstruktion ermöglichte es, das neuentdeckte *ciaH*-Allel im Wildtyp R6 zu testen. Hierbei zeigte sich, dass *ciaH773* einen 11-fachen Anstieg der CiaR-Aktivität im Vergleich zum WT-Allel bewirkt (4.2.2.2). Diese Aktivitätssteigerung ging mit einer Erhöhung der Resistenz für Cefotaxim und Oxacillin, sowie mit dem Verlust der natürlichen Transformierbarkeit einher. Phänotypen, die bereits bei anderen hyperaktiven *ciaH*-Allelen beobachtet werden konnten (Müller *et al.*, 2011).

Viele Histidinkinasen sind biofunktional, was bedeutet, dass sie sowohl Kinase-, als auch Phosphataseaktivität besitzen (Alves und Savageau, 2003). Die Histidinkinase kann somit den Phosphorylierungsgrad des Responserregulators sowohl durch Phosphorylierung (Kinase), als auch durch Dephosphorylierung (Phosphatase) beeinflussen. Die Daten von Halfmann *et al.*, lassen darauf

schließen, dass auch CiaH bifunktional ist (Halfmann *et al.*, 2011). So konnte gezeigt werden, dass die Kinase im BHI und THB-Medium für die Erhaltung der hohen Basalaktivität erforderlich ist. Die Deletion von CiaH führte hingegen im C+Y-Medium zu einer Verdopplung der CiaR-Aktivität. Im C+Y-Medium agiert CiaH somit als Phosphatase. Der Responseregulator CiaR muss demnach noch auf einem anderen, CiaH-unabhängigen Weg phosphoryliert werden.

Das Allel *ciaH773* zeigt eine deutlich stärkere Aktivierung (11-fach) der CiaR-vermittelten Genregulation, wie es beim Fehlen von CiaH im C+Y-Medium beobachtet werden konnte. Das Fehlen der Phosphataseaktivität kann demnach als alleinige Ursache für den enormen Aktivitätszuwachs ausgeschlossen werden. Der Aminosäureaustausch von Alanin zu Glutamat an Position 258 scheint vielmehr die Kinaseaktivität von CiaH zu stimulieren.

Die Veränderung in PCPC führte zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Glutamat und folglich zu einem Austausch von einer unpolaren, ungeladenen Aminosäure zu einer polaren, negativ geladenen Aminosäure. Der Austausch einer ungeladenen zu einer geladenen Aminosäure konnte bereits bei der Labormutanten C102 beobachtet werden, dem ersten Familienmitglied einer auf Cefotaxim selektierten Mutantenfamilie. C102 weist einen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin an Position 236, also in unmittelbarer Nähe des konservierten Histidins (H226), auf. *CiaH102* ist das *ciaH*-Allel mit dem stärksten aktivierenden Effekt auf die CiaR-vermittelte Genregulation (Müller *et al.*, 2011). Die geladenen Seitenketten können durch elektrostatische Wechselwirkung mit anderen Aminosäuren Einfluss auf die Konformation eines Proteins nehmen. Eine strukturelle Veränderung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen könnte die stark erhöhte Kinaseaktivität von CiaH in C102, sowie in PCPC erklären.

Die ersten Mutationen in der Histidinkinase CiaH wurden bei Untersuchungen der β -Lactamresistenz durch Antibiotikaselektion im Labor entdeckt (Guenzi *et al.*, 1994). Auch das in dieser Arbeit charakterisierte *ciaH*-Allel ist unter Laborbedingungen entstanden. Veränderungen der Sensorkinase konnten aber auch in klinischen Isolaten identifiziert werden. Von Moscoso *et al.*, wurde eine *ciaH*-Punktmutation in dem Vancomycin-toleranten Stamm Tupelo beschrieben, die ihren Träger Schutz vor der Vancomycin induzierten Zelllyse verleiht (Moscoso *et al.*, 2010). Im Zuge der immer populärer werdenden Methode der Genomsequenzierung und der stets wachsenden Anzahl von sequenzierten Pneumokokkengenomenen, konnten weitere *ciaH*-Veränderungen in klinischen Isolaten identifiziert werden. Einige dieser *ciaH*-Allele wurden von Marx (2013) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sie die CiaR-abhängige Promotoraktivität um das bis zu dreifache erhöhen (Marx, 2013).

CiaRH war die erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante, die in *S. pneumoniae* entdeckt wurde. Müller *et al.* (2011) beschrieben, dass es die Höhe der Resistenz gegen β -Lactamantibiotika mit der Aktivierungsstärke der CiaR-vermittelten Genregulation korreliert und die Deletion von CiaR nur zu

einer geringfügigen Veränderung der MHK führt. Auch das in dieser Arbeit identifizierte *ciaH*-Allel erhöht die Resistenz gegenüber Cefotaxim. Das Resistenzniveau des Wildtyps R6 konnte durch Einbringen von *ciaH773* verdoppelt werden (4.2.2.2). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass auch der Resistenzanstieg des vierten Selektionsschrittes hauptsächlich durch *ciaH773* vermittelt wird (4.2.3).

In früheren Studien wurde beschrieben, dass die, durch die Aktivierung des CiaRH-Systems bedingte β -Lactamresistenz hauptsächlich durch die fünf csRNAs, die zu den stärksten CiaR-abhängigen Genen des Regulons zählen, vermittelt wird. Die Deletion von *ccnA-E* führte in einem Stamm mit aktiviertem CiaRH-System zum Verlust der Cefotaximresistenz (Müller, 2011). Analysen mit einzelnen csRNAs bzw. verschiedener Kombinationen lassen auf eine additive Wirkung der csRNAs auf die β -Lactam spezifischen Zielgene der csRNAs schließen (Laux, 2014).

Neben dem Anstieg der β -Lactamresistenz führte das Einbringen von *ciaH773* in R6 zu einem Verlust der natürlichen Transformierbarkeit (4.2.2.2). Auch in PCPC, PCPCC und PCPCCO, die alle das *ciaH773*-Allel enthalten, konnte keine Expression der Kompetenzgene (*comX*, *cib*) verzeichnet werden. Bei der Kompetenzentwicklung von *S. pneumoniae* spielen Parameter wie der pH-Wert, die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur eine Rolle (Tomasz und Hotchkiss, 1964; Chen und Morrison, 1987; Echenique *et al.*, 2000). Auch intrazelluläre Bedingungen, wie die Regulation durch Oxidasen, Proteasen oder Zweikomponentensysteme können sich auf die Kompetenzentwicklung auswirken (Chastanet *et al.*, 2001; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Echenique und Trombe, 2001a, Echenique und Trombe, 2001b). Eine inhibierende Wirkung eines stark aktivierten CiaRH-Systems konnte bereits von Guenzi *et al.* beobachtet werden (Guenzi *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des CiaRH-Systems unter kompetenzinhibierenden Bedingungen zur Kompetenzentwicklung führt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003). Im Zuge mehrerer Transkriptomanalysen konnte eine erhöhte Transkriptmenge in Kompetenzgenen infolge der CiaRH-Deletion verzeichnet werden, allerdings zeigte keines der identifizierten Gene eine CiaR-Bindestelle (Echnique *et al.*, 2000; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b). Der beobachtete Effekt des CiaRH-System auf die Kompetenz muss folglich indirekt sein.

Für zwei Mitglieder des CiaR-Regulons, die Serinprotease HtrA und die fünf csRNAs, konnte ein Effekt auf die Kompetenz nachgewiesen werden (Müller, 2011, Laux *et al.*, 2015). Beide wirken sich negativ auf die Kompetenzentwicklung auf. So kann der, durch das aktivierende *ciaH202*-Allel vermittelte Kompetenzblock durch die Deletion der fünf *csRNA*-Gene vollständig aufgehoben werden (Müller, 2011). Bei der Wirkung der csRNAs und HtrA auf die Kompetenz handelt es sich um eine negative Feedbackregulation. So konnte gezeigt werden, dass sich die Kompetenz selbst positiv auf das CiaRH-System auswirkt (Kaysen, 2012). Diese erhöhte CiaRH-Aktivität führt wiederum zu einer stärkeren

Expression der fünf csRNAs, sowie *htrA* und demnach zu einer negativen Wirkung auf die Kompetenz. Die fünf csRNAs wirken hierbei additiv auf die Kompetenzunterdrückung (Laux *et al.*, 2015). Weiterhin konnte das Gen *comC*, welches für das Kompetenz stimulierende Peptid CSP codiert, als ein Zielgen der csRNAs identifiziert werden (Laux, 2014). Auch die Deletion von *htrA* führt zu einer Minderung des Kompetenzblocks. Dieser Effekt ist allerdings deutlich schwächer ausgeprägt, wie im Falle der csRNA-Deletion (Müller, 2011). Der Einfluss von HtrA auf die Kompetenzentwicklung wird in 5.2.2.2 detailliert besprochen.

5.2.2.1.1 Die rätselhafte Rolle der Punktmutation in *spr1992*

Neben der *ciaH*-Mutation ereignete sich im vierten Selektionsschritt eine Punktmutation in *spr1992*, die in einen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin an Position 272 des 475 Aminosäure langen Proteins resultierte. Beim Genprodukt von *spr1992* handelt es sich um ein hypothetisches Protein. Blast-Analysen offenbarten das Vorhandensein eines Helix-Turn-Helix-Motivs, ein Strukturelement, das oft bei bakteriellen Transkriptionsregulatoren vorzufinden ist, und lassen demnach auf eine regulatorische Funktion von Spr1992 schließen.

Die innerhalb dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die *spr1992*-Punktmutation nicht zufällig ereignete, sondern höchstwahrscheinlich einen Beitrag auf die CiaRH-Aktivität, sowie die Cefotaximresistenz in PCPC nimmt (4.2.5). So erreichte der Stamm PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEX773*, der sich laut den Sequenzierungsergebnissen nur durch die Punktmutation in *spr1992* von PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEX773* unterscheidet, weder das Resistenzniveau, noch die CiaR-Aktivität von PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEX773*. Dieser Beitrag konnte allerdings nur im genetischen Hintergrund des hyperaktiven *ciaH773*-Allels beobachtet werden. Der Stamm PCPC Δ *ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaHR6* (4.2.3.1), der das Wildtyp *ciaH* unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierten Promotors enthält, weist die gleiche β -Galaktosidaseaktivität wie R6 auf. Ein stimulierender Effekt durch das Vorhandensein der *spr1992*-Punktmutation konnte hier nicht verzeichnet werden. Eine Deletion von *spr1992* in unterschiedlichen Backgrounds hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität des CiaRH-Systems (4.2.5).

Das Gen *spr1992* war bereits Gegenstand von mehreren vorangegangenen Arbeiten (Kirsch, 2011; Bugaeva, 2013; Bugaeva, 2014). So tauchte es auf einer Liste von potentiellen Zielgenen der csRNAs auf. Die nachfolgenden *in vivo* Arbeiten führten zu kontroversen Ergebnissen. Während die Transkriptionsfusion (pPT2_*spr1992*), die Messung der Promotorstärke, eine Promotoraktivität bescheinigte, die mit rund 100 Units, der eines mittelstarken Promotors entspricht, konnte in der

nachfolgenden Translationsfusion (pPT2_ *spr1992*) keine Expression der β -Galaktosidase mehr detektiert werden. Im Zuge einer Bachelorarbeit (Forler, 2014) wurde die Bedeutung einer potentiellen Repressorbindestelle downstream des *spr1992*-Promotors, ein Repeat, untersucht (4.2.5). Durch gezielte Zerstörung dieses Repeats konnte die Expression von *spr1992* auf 10 Units gesteigert werden. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der identifizierten Repeatsequenz tatsächlich um eine Repressorbindestelle bzw. um einen Teilbereich einer Repressorbindestelle handelt. Durch Halbierung des Repeats wurde die Affinität des Repressors zu dieser veränderten Bindestelle herabgesetzt, aber nicht vollständig aufgehoben (4.2.5). Durch die Herstellung weiterer Transkriptionsfusionen, z.B. in denen die Repeatsequenz mutiert ist, könnte die Lokalisation der Repressorbindestelle weiter spezifiziert werden. Die Vermutung einer Autoregulation von *spr1992* konnte nicht bestätigt werden (Forler, 2014).

Warum *spr1992* nur äußerst gering exprimiert wird bleibt unklar. Denkbar wäre eine stark bedingungsabhängige Expression des potentiellen Regulators. Welche Bedingungen dies sind bleibt zu untersuchen.

Die Punktmutation in *spr1992* hat sich zusammen mit der Punktmutation in *ciaH* (*ciaH773*) im vierten Selektionsschritt ereignet. Dabei muss klar gesagt werden, dass der hauptsächlichste Resistenzanstieg des vierten Selektionsschrittes, sowie die Hyperaktivierung des CiaRH-Systems durch *ciaH773*, und nicht durch die Punktmutation in *spr1992*, vermittelt wurde (4.2.5). Dennoch scheint die Veränderung in *Spr1992* zur Resistenzentwicklung, sowie zur Aktivität des CiaRH-Systems im vierten Selektionsschritt beizutragen (4.2.5).

Das Gen *spr1992* wurde schon einmal mit Cefotaximresistenz in Verbindung gebracht. So tauchte es in einer von Fani *et al.* veröffentlichten Studie von Cefotaxim-resistenten Pneumokokken-Isolaten auf (Fani *et al.*, 2013). Die dort identifizierte Punktmutation ereignete sich an Position 177 und resultierte in einem Nonsenseprotein. In welchem Maße diese Veränderung zur Cefotaximresistenz beiträgt bleibt zu klären. Interessant zu bemerken ist, dass auch die innerhalb dieser Arbeit identifizierte *spr1992*-Punktmutation durch die Selektion mit Cefotaxim erhalten wurde.

Aufgrund der in 4.2.1.1 erwähnten Sequenzierungslücken kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im vierten Selektionsschritt noch eine weitere, bis dato unbekannte Mutation ereignet hat. Während im fünften und sechsten Selektionsschritt durch Nachstellen der Veränderungen klar gezeigt werden konnte, dass die beobachteten Phänotypen auf die jeweilige Mutation zurückzuführen sind (4.2.3.1, 4.2.6), kann dies im Falle von *spr1992* nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen aber zusammen mit den Hinweisen, dass es sich bei *spr1992* um ein mögliches Zielgen der csRNAs handelt auf einen Zusammenhang des Genproduktes von

spr1992 und dem CiaRH-System schließen. Wie genau diese Interaktion aussieht, bleibt zum heutigen Zeitpunkt allerdings fraglich. Um zu klären, ob es sich bei *spr1992* wirklich um ein Zielgen der csRNAs handelt wäre es wichtig Bedingungen zu finden, in denen *spr1992* gut exprimiert wird. Ebenfalls denkbar wäre die *spr1992*-Punktmutation in R6-Stämme mit unterschiedlichen *ciaH*-Allelen einzubringen und die Auswirkungen auf die Aktivität des Zweikomponentensystems und die Resistenz zu überprüfen.

5.2.2.2 Die Veränderung des fünften Selektionsschrittes – Das Ausschalten der Serinprotease HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems

Die Expression des Genes *htrA*, steht in *S. pneumoniae* unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems CiaRH und gehört zu den am stärksten CiaR-abhängigen Genen des Regulons (Halfmann *et al.*, 2007b). *HtrA* codiert für die Serinprotease HtrA, die der Familie der Hitzeschock induzierten trypsinähnlichen Serinproteasen angehört. HtrA-Proteine besitzen eine ATP-unabhängige Proteaseaktivität, fungieren aber auch als Chaperone (Kim und Kim; 2005). So sind sie häufig an der Stressantwort der Zelle beteiligt, wo sie die Qualitätskontrolle von falsch oder unvollständig gefalteten Proteinen übernehmen, die unter diesen Bedingungen vermehrt auftreten. Des Weiteren wurden Beteiligungen von HtrA-Proteinen an der Kompetenz (Ibrahim *et al.*, 2004b; Sebert *et al.*, 2005), sowie an der Virulenz (Jones *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2004a) beobachtet.

In der Mutante des fünften Selektionsschritts, PCPCC, ereignete sich eine 10 bp-Deletion in *htrA*. Aufgrund der Lokalisation im ersten Drittel der Serinprotease ist dies mit einem Knockout von HtrA vergleichbar. Die Deletion in HtrA führt in PCPCC zu einer weiteren Steigerung der CiaR-vermittelten Genregulation. Die Aktivität, des ohnehin, aufgrund des *ciaH773*-Allels, hyperaktive CiaRH-System konnte nochmal um den Faktor 1,3 gesteigert werden. Ebenfalls konnte ein Anstieg der Resistenz gegenüber Piperacillin, Cefotaxim und Oxacillin beobachtet werden, wobei der größte MHK-Sprung für Cefotaxim zu verzeichnen war (4.2.1). Dass diese Aktivitätssteigerung, sowie die Cefotaximresistenz auf andere, aufgrund der Sequenzierungslücken nicht identifiziertem Veränderungen zurückzuführen sind, kann aufgrund des Nachstellens der Veränderung des fünften Selektionsschrittes, nahezu ausgeschlossen werden (4.2.3.1).

Ein regulatorischer Effekt von HtrA auf das CiaRH-System konnte bereits in früheren Arbeiten beobachtet werden. Das Fehlen von HtrA führte zu einer Steigerung der CiaR-vermittelten Genexpression, die Aktivität der stark CiaR-anhängigen Promotoren erhöhte sich um das Vierfache (Müller, 2011). Ebenfalls beschrieben wurde, dass in einem bereits aktivierten CiaRH-System das

Fehlen von HtrA keine zusätzliche Aktivitätssteigerung des Systems bewirkt (Müller, 2011). Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden (4.2.4). Die Deletion der Serinprotease, sowohl im R6 Hintergrund mit hyperaktiven *ciaH773*-Allel, als auch mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel, führte zu einer Steigerung der CiaR vermittelten Promotoraktivität. In beiden Fällen steigerte sich die Aktivität des bereits stark aktivierten Zweikomponentensystems nochmal um das 1,6-fache (4.2.4). Ebenfalls führte die *htrA*-Deletion in PCPC zu einer Erhöhung der CiaR-vermittelten Genregulation. Eine Erklärung dafür, warum die Daten nicht mit denen von Müller (2011) übereinstimmen, könnte in der Instabilität der Stämme zu finden sein. In früheren Arbeiten (Müller, 2011; Laux, 2014), sowie im Zuge dieser Arbeit fiel auf, dass bei einem hyperaktiven CiaRH-System vermehrt Punktmutationen auftreten, die zu einer Aktivitätsminderung des Systems führen. Dies war umso ausgeprägter, je stärker die Aktivierung war. Möglicherweise ereigneten sich in den Arbeiten von Müller (2011) aufgrund der, durch das Fehlen von HtrA nochmals gesteigerten Aktivität, sekundäre Mutationen, die die Hyperaktivität des CiaRH-Systems herabsenkten. Durch die in dieser Arbeit verwendete Tetracyclin-induzierte Promotorkonstruktion konnte das Risiko für Sekundarmutationen minimiert werden.

Wie genau HtrA auf CiaR wirkt ist unbekannt. Aufgrund der räumlichen Trennung der extrazellulär liegenden Serinprotease HtrA und dem sich im Cytoplasma befindlichen Responseregulator CiaR ist eine direkte Interaktion unwahrscheinlich. Dennoch sind mehrere Möglichkeiten vorstellbar, wie HtrA auf den Responseregulator wirken kann.

Aufgrund der Tatsache, dass der HtrA-Effekt auch in Abwesenheit von CiaH vorhanden, allerdings weniger ausgeprägt ist (Müller, 2011), lässt vermuten, dass ein Kinase-abhängiger, sowie ein Kinase-unabhängiger Weg existiert, wie die Serinprotease auf das CiaRH-System wirken kann.

Denkbar wäre, dass HtrA mit der Sensorkinase eines anderen Zweikomponentensystems interagiert und dieses über Crosstalk den Phosphorylierungsstatus von CiaR beeinflusst. Zwar gibt es Hinweise auf eine regulatorische Verbindung des CiaRH-System mit anderen Zweikomponentensystemen von *S. pneumoniae*, eine direkte regulatorische Verbindung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Dagkessamanskaia *et al.* 2004; Heintz, 2006; Dawid *et al.*, 2009). Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktion einer Histidinkinase mit ihrem dazu gehörigen Responseregulator sehr spezifisch ist, führt dazu, dass Crosstalk relativ selten auftritt (Laub und Goulian, 2007). In einer Studie in *E. coli* wurden alle Proteine auf Crosstalk hin überprüft. Dabei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass von den 692 möglichen Crosstalk-Paaren nur in 3% der Fälle Crosstalk beobachtet werden kann (Yamamoto *et al.*, 2005). Bei *in vivo* Experimenten konnte Crosstalk nur in Abwesenheit der zugehörigen Histidinkinase bzw. des Responseregulators beobachtet werden. Aufgrund der Phosphataseaktivität, die bifunktionale Sensorkinasen besitzen, können sie die Phosphorylierung ihres korrespondierenden

5. Diskussion

Responseregulators durch fremde Kinasen verhindern. Auch der Responseregulator kann selbst durch Interaktion mit „seiner“ Sensorkinase verhindern, dass diese als Phosphodonor für fremde Responseregulatoren anderer Zweikomponentensysteme agiert. Da der HtrA-Effekt auch in Anwesenheit von CiaH klar erkennbar ist, und CiaH sowohl Kinase-, wie auch Phosphataseaktivität besitzt (Halfmann *et al.*, 2011) scheint eine Interaktion über Crosstalk eher unwahrscheinlich.

Außer durch Crosstalk können Zweikomponentensysteme auch über sogenannte Hilfsregulatoren miteinander verbunden werden. Hierbei handelt es sich um Proteine, deren Expression selbst von einem anderen Regulationssystem, z.B. ein Zweikomponentensystem, kontrolliert wird und die posttranskriptionell auf die Aktivität von Histidinkinase oder Responseregulator wirken können (Mitrophanov und Groisman, 2008). Es wäre denkbar, dass HtrA durch Interaktion mit einer Sensorkinase deren Aktivitätsstatus beeinflusst und somit indirekt auch die Expression eines Hilfsregulators, der dann wiederum auf CiaH oder CiaR wirken kann. Ebenfalls wurden Hilfsregulatoren beschrieben, die in Abhängigkeit verschiedenster Bedingungen die Aktivität von Zweikomponentensystem beeinflussen (Mitrophanov und Groisman, 2008; Buelow und Raivio, 2010). So können sie sowohl auf die Histidinkinase, wie auch auf den Responseregulator wirken. Auch die Art ihrer Wirkung ist vielfältig. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass diese Proteine den Responseregulator dephosphorylieren können (Perego und Brannigan, 2001), wie ihm vor Dephosphorylierung bewahren (Kato und Groisman, 2004).

Ein gut dokumentiertes Beispiel, dass Mitglieder eines Regulons, die Aktivität des eigenen Regulators beeinflussen können findet sich, beim HtrA Homolog von *E. coli*, DegP. DegP wirkt in Zusammenarbeit mit dem sogenannten Adaptorprotein CpxP auf die Aktivität des Zweikomponentensystems CpxAR. CpxP ist selbst Mitglied des Regulons und bindet an die Histidinkinase CpxA und inhibiert dieses. Erhöht sich bei Stressbedingungen die Anzahl an falschgefalteter Proteine im Periplasma, löst sich CpxP von CpxA und bindet an die aggregierten Proteine. Der dadurch entstehende CpxP-Proteinaggregat-Komplex wird von DegP abgebaut (Isaac *et al.*, 2005). Aufgrund des Lösens des Inhibitors von der Histidinkinase erhöht sich die Aktivität des Zweikomponentensystems. Wenn kein Stimulus mehr vorhanden ist, wird aufgrund des Bindens von CpxP an CpxA die Aktivität des Systems wieder herunter gefahren.

Demnach wäre eine Interaktion von HtrA auf CiaR auch ohne Beteiligung eines weiteren Zweikomponentensystems denkbar. Hinweise auf ein Adaptorprotein innerhalb des CiaRH-Regulons, wie CpxP bei *E. coli*, liegen zum heutigen Zeitpunkt allerdings nicht vor.

CiaR ist immer aktiv, auch in Abwesenheit der korrespondierenden Sensorkinase. Demnach muss noch ein alternativer Phosphodonor neben CiaH existieren. Eine Möglichkeit, wie CiaR auch in Abwesenheit von CiaH phosphoryliert werden kann, der Crosstalk mit einer fremden Sensorkinase,

wurde bereits besprochen. Als alternative Phosphatquelle können auch niedermolekulare, hochenergetische Verbindungen wie Acetylphosphat in Betracht gezogen werden (Lukat *et al.*, 1992; Wanner, 1992). In vivo tritt dies weitaus häufiger wie Crosstalk auf.

Innerhalb der Zelle ändert sich der Acetylphosphatspiegel je nach Umweltbedingungen und stellt wahrscheinlich so eine Verbindung zwischen dem Metabolismus der Zelle und der Signaltransduktion über Zweikomponentensysteme dar (Wolfe 2005, Laub und Goulian, 2007). In Pneumokokken entsteht Acetylphosphat als Zwischenprodukt des Pyruvatmetabolismus und kann über drei Reaktionswege synthetisiert werden. In Abbildung 5.2 sind die Reaktionswege zur Acetylphosphatgenerierung, sowie die dazu gehörigen Enzyme schematisch dargestellt. Die Phosphotransacetylase (Pta) setzt Acetyl-CoA und Phosphat (P_i) reversibel in Acetylphosphat und Coenzym A um. Die Acetatkinase (AckA) wandelt Acetat unter ATP-Verbrauch in Acetylphosphat und ADP (Carvalho *et al.*, 2011; Ramos-Montanez *et al.*, 2008). Auch dabei handelt es sich um eine reversible Reaktion. Der dritte Weg, auf dem Acetylphosphat synthetisiert werden kann, ist die Umwandlung von Pyruvat in Anwesenheit von Phosphat und Sauerstoff zu Acetylphosphat. Katalysiert wird diese irreversible Reaktion durch die Pyruvatoxidase (SpxB). Als Nebenprodukte entstehen CO_2 und H_2O_2 (Spellerberg *et al.*, 1996). Es scheint, dass der größte Teil der Acetylphosphatproduktion in *S. pneumoniae* durch SpxB katalysiert wird (Pericone *et al.*, 2003; Ramos-Montanez *et al.*, 2008). In einer kürzlich erschienen Proteom-Studie konnte gezeigt werden, dass SpxB wahrscheinlich an der Außenseite der Zelle lokalisiert ist (Pribyl *et al.*, 2014). Dies macht die Pyruvatoxidase zu einem interessanten Kandidaten für den Kinase-unabhängigen HtrA-Effekt. Demnach wäre es denkbar, dass HtrA SpxB attackiert und die intrazelluläre Acetylphosphatmenge folglich absinkt. Von Marx *et al.*, konnte gezeigt werden, dass die *spxB*-Deletionsmutante eine deutlich geringere Acetylphosphatmenge wie der Wildtyp R6 aufweist (Marx *et al.*, 2015). In Abwesenheit von HtrA würde demnach eine größere Menge Acetylphosphat als Phosphordonor für CiaR zur Verfügung stehen und somit zu einer stärkeren Aktivierung des CiaRH-Systems beitragen.

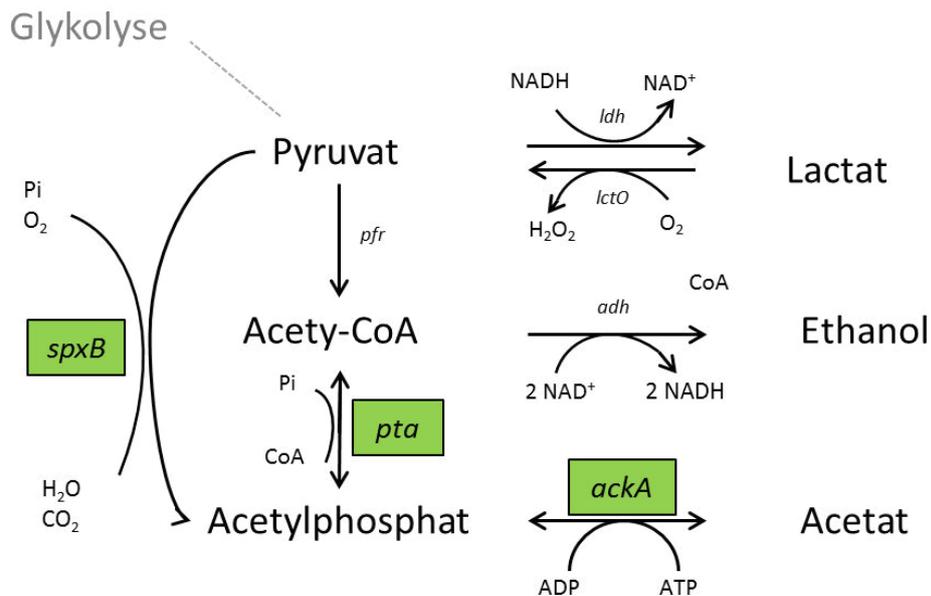


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Pyruvatmetabolismus in *S. pneumoniae* (nach Ramos-Montanez *et al.*, 2008 und Carvalho *et al.*, 2011)

Pyruvat entsteht als Endprodukt der Glykolyse. Im homofermentativen Stoffwechsel wird hauptsächlich Lactat gebildet, im heterofermentativen Stoffwechsel entstehen zusätzlich Acetat, Formiat und Ethanol. Die Gene, deren Genprodukte, die jeweiligen Reaktionen katalysieren sind neben den Synthesewegen abgebildet. Die Gene, die zur Synthese von Acetylphosphat erforderlich sind, sind durch grüne Kästchen hervorgehoben. *spxB*: Pyruvatoxidase, *pta*: Phosphotransacetylase; *ackA*: Acetatkinase, *ldh*: Lactatdehydrogenase, *lctO*: Lactatoxidase, *pfr*: Pyruvat-Formiat-Lyase, *adh*: Alkoholdehydrogenase

Das Signal für die Histidinkinase CiaH ist unbekannt. Als Stimulus wurden Ca²⁺- und Phosphat, die O₂-Konzentration sowie durch Antibiotikazugabe verursachte Schädigung der Zellhülle diskutiert (Echenique *et al.*, 2000; Giammarinaro *et al.*, 1999, Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2007). Möglich, dass CiaH auf Stressbedingungen unterschiedlicher Art reagiert. Die Familie der Hitzeschock induzierten trypsinähnlichen Proteasen, denen auch HtrA angehört, sind häufig an der Proteinkontrolle beteiligt (Kim und Kim, 2005). Auch für HtrA konnte ein Mitwirken am Wachstum unter Stressbedingungen beobachtet werden (Sebert *et al.*, 2005). Der Kinase-abhängige HtrA-Effekt könnte auch über eine Anhäufung von nicht- bzw. falsch gefalteten Proteinen erklärt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde beobachtet, dass das Fehlen von HtrA im genetischen Hintergrund eines hyperaktiven CiaRH-Systems zu einer weiteren Aktivitätssteigerung des Zweikomponentensystems führt (4.2.4). Würde man nun annehmen, dass Stressbedingungen als Signal für CiaH fungieren, so ist es durchaus denkbar, dass im Falle der Deletion der Serinprotease, das Stresslevel der Zelle nochmals aufgrund vermehrt auftretender falsch oder fehlerhaft gefalteter Proteine ansteigt und dies eine Aktivitätssteigerung des CiaRH-Systems bewirkt.

Neben den hier aufgezeigten Möglichkeiten könnte HtrA auch direkt auf CiaH wirken und so in den Aktivitätsstatus des Zweikomponentensystems eingreifen.

Ein hyperaktiviertes CiaRH-System ist mit dem Verlust der natürlichen Transformierbarkeit, sowie mit einer Erhöhung der Cefotaximresistenz verbunden. Im Zuge früherer Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem die stark CiaR-abhängigen Gene *htrA* und *ccnA-E* an der Vermittlung dieser Phänotypen beteiligt sind. So kann der Kompetenzblock, der durch die stark aktivierenden *ciaH*-Allele *ciaH202* und *ciaH306* hervorgerufen wird, durch Deletion der fünf *csRNA*-Gene aufgehoben werden. Ebenfalls beschrieben ist, dass die Deletion von *htrA* in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH-System den Kompetenzblock zwar nicht vollständig aufheben kann, aber dennoch zu einer messbaren Kompetenzentwicklung führt (Müller, 2011). In einer Studie von 2005 mit einem Stamm mit aktiviertem CiaRH-System (*ciaH306*-Allel) und einem mutierten, proteaseinaktiven HtrA (S234A) konnte ebenfalls eine Kompetenzentwicklung beobachtet werden. Die Kompetenz konnte hierbei wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden (Sebert *et al.*, 2005). Die Hypothese, dass der kompetenzinhibierende Effekt von HtrA durch eine Interaktion der Serinprotease mit der Histidinkinase ComD zurück zu führen ist, konnte nicht bestätigt werden (Sebert, 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass HtrA CSP abbauen kann und sich somit negativ auf die Kompetenzentwicklung der Zelle auswirkt (Stevens *et al.*, 2011; Cassone *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde sich mit dem Einfluss von HtrA auf die Kompetenzentwicklung in einem Stamm mit bereits stark aktiviertem CiaRH-System befasst. Beim Vergleich der Transkriptomprofile von $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773$ und $R6\Delta ciaHpPP2_{htrA}pTEXciaH773\Delta htrA$ zeigte sich, dass durch Deletion der Serinprotease die Expression mehrerer Gene des Kompetenzregulons, darunter die der Histidinkinase ComD und des Responseregulators ComE eine bis zu 20-fach erhöhte Transkriptionsstärke aufweisen. Von den insgesamt 31 hochregulierten Genen konnten 27 dem Kompetenzregulon zugeordnet werden (Peterson *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu konnte allerdings keine Kompetenzentwicklung aufgrund des Fehlens von HtrA bei $PCPC\Delta ciaHpTEXciaH773$ und $PCPC\Delta ciaHpTEXciaH773$ festgestellt werden (4.2.3). Die Transformanten des vierten und fünften Selektionsschrittes, weisen beide ein hyperaktives CiaRH-System auf und unterscheiden sich nur durch die 10 bp-Deletion in HtrA. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke der beiden Kompetenzgene *comX* und *cib* aufgrund der *htrA*-Deletion verzeichnet werden. Der durch *ciaH773*-vermittelte Kompetenzblock wurde durch das Fehlen der Serinprotease nicht aufgehoben.

Auf den ersten Blick scheinen die hier erzielten Daten im Widerspruch zu stehen. Vergleicht man aber das in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomexperiment mit einer früheren Transkriptomanalyse eines kompetenten zu einem nichtkompetenten Pneumokokkenisolats (Laux, 2014) fällt ein deutlicher Unterschied in der Expression der Kompetenzgene auf. In der von Laux, 2014 durchgeführten Analyse weist der kompetente im Vergleich zum nicht kompetenten

S. pneumoniae Stamm eine zwischen 200 bis über 1000fache erhöhte Expression der Kompetenzgene auf. In dieser Arbeit wurde lediglich eine bis zu 20fach erhöhte Transkriptmenge beobachtet. Demnach stehen die hier erzielten Daten auch nicht im Widerspruch. Durch die *htrA*-Deletion konnte die Expression der Kompetenzgene zwar gesteigert und somit der in der Literatur beschriebenen inhibierende Effekt der Serinprotease auf die Kompetenz (Sebert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2011, Müller, 2011) teilweise bestätigt werden, eine Kompetenzentwicklung hat allerdings nicht stattgefunden.

Wichtig zu bedenken ist, dass es sich beim CiaRH um ein autoreguliertes System handelt und das Fehlen von HtrA sich auf das gesamte Regulon auswirkt. So kommt es in Abwesenheit von HtrA unter anderem zu einer stärkeren Expression der fünf csRNAs, die sich inhibierend auf die Kompetenz auswirken (Laux *et al.*, 2015).

Ein Teil der innerhalb der Transkriptomanalyse hoch bzw. größtenteils runterregulierten Genen, konnte als Gene identifiziert werden, die durch den transkriptionellen Regulator CcpA reguliert werden (Carvalho *et al.*, 2011). Bei CcpA handelt es sich um ein globales Regulatorprotein des Zentralmetabolismus, das weit verbreitet unter den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt ist (Egeter und Brückner, 1996; Henkin *et al.*, 1991; Burne *et al.*, 1999). Es gehört zu den Hauptregulatoren des Kohlenstoffmetabolismus und übt eine entscheidende Rolle innerhalb der Katabolitrepression aus. Enzyme, die an dem Stoffwechsel von komplexen Zuckern beteiligt sind, werden in Anwesenheit von Monosacchariden, wie Glucose, durch CcpA reprimiert (Deutscher *et al.*, 2006). Denkbar wäre, dass HtrA Transporter attackiert und so Einfluss auf die Transportvorgänge der Zelle, wie die Zuckeraufnahme nimmt. Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass der Großteil der innerhalb der Transkriptomanalyse identifizierten CcpA-regulierten Gene in Abwesenheit von HtrA runterreguliert ist.

Die Kompetenzgene, sowie die CcpA-regulierten Gene legen nahe, dass innerhalb der hier durchgeführten Transkriptomanalyse (4.2.4.1) eher weniger stark exprimierte Gene als signifikant verändert auftreten. Der inhibierende Effekt von HtrA auf die Kompetenz, der in der Literatur beschrieben ist (Sebert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2011, Müller, 2011) ist klar innerhalb der Mikroarray-Daten ersichtlich. Eine Aufhebung des durch *ciaH773*-vermittelten Kompetenzblocks infolge der *htrA*-Deletion, wie es die Transkriptomanalysen auf den ersten Blick vermuten lassen, konnte aber durch Messung der Promotorstärke der beiden Kompetenzgene *comX* und *cib* in PCPC Δ *ciaHpPP2*_{*htrA*}TEX*ciaH773* und PCPC Δ *ciaHpPP2*_{*htrA*}TEX*ciaH773* nicht verzeichnet werden. Denkbar, dass ein geringfügiger Unterschied in der Expression der Kompetenzgene aufgrund der niedrigen Promotorstärken nicht nachgewiesen werden konnte. Die Messung der Transformationseffizienz mittels einem Transformationsmarkes könnte hier Aufschluss liefern. Klar

ist allerdings, dass durch die Durchführung weiterer Tests eventuell zwar minimale Unterschiede im Kompetenzverhalten von PCPC und PCPC identifiziert werden können, dennoch bleibt der von *ciaH773* vermittelte Kompetenzblock größtenteils erhalten. Dies legt nahe, dass es sich bei den, innerhalb dieser Transkriptomanalyse identifizierten Genen um eher niederexprimierte Gene handelt und vielmehr Schwankungen des Basalniveaus erfasst wurden. Einen Hinweis darauf liefert auch das Gen *bglA* (*spr0244*), welches innerhalb der Transkriptomanalyse als signifikant runterreguliert identifiziert werden konnte. *BglA* codiert für die 6-Phospho- β -Glucokinase, die die Hydrolyse Cellulose-6-phosphat zu Glucose und Glucose-6-Phosphat katalysiert. Eine hohe Expression von *bgsA* ist aufgrund der im C+Y-Medium vorkommenden Einfachzucker nicht zu erwarten. Denkbar, dass die zur Microarray-Analyse eingesetzte RNA-Menge zu hoch war und stark exprimierte Gene in einen Sättigungsbereich fallen und demnach keine signifikante Unterschiede mehr zu verzeichnen sind. Eine erneute Transkriptomanalyse mit einer geringeren RNA-Menge könnte hierüber Aufschluss liefern.

Im fünften Selektionsschritt ereignete sich eine 10 bp Deletion innerhalb der Serinprotease HtrA. Diese Deletion hatte ein Stopcodon an Position 125, der 397 Aminosäuren langen Protease zur Folge, was einem Knockout von HtrA gleich kommt. Diese Veränderung führte zu einer Erhöhung der CiaR-vermittelten Genregulation, sowie zu einer Steigerung der β -Lactamresistenz. Ein Resistenzanstieg konnte für alle drei getesteten β -Lactamantibiotika (Piperacillin, Cefotaxim und Oxacillin) beobachtet werden, wobei dieser für Cefotaxim mit 4 auf 7 $\mu\text{g/ml}$ am ausgeprägtesten war. Durch Ausschalten von HtrA im Vorgängerstamm von PCPC (PCPC) und anschließender MHK-Analyse konnte dieser Resistenzanstieg eindeutig auf die *htrA*-Deletion zurückgeführt werden (4.2.3.1).

Im R6-Hintergrund mit aktiviertem CiaRH-System ($R6\Delta\text{ciaHpPP2}_{\text{htrA}}\text{TEXciaH773}$) führte das Ausschalten von HtrA zu keiner Resistenzerhöhung, trotz einer Steigerung der CiaR vermittelten Genregulation (4.2.4). Warum diese Diskrepanz vorliegt ist schwer zu beantworten. Möglicherweise ist der Effekt der *htrA*-Deletion auf die Resistenz im Wildtyphintergrund sehr gering und die in dieser Arbeit gewählten Resistenzsprünge müssten in einer erneuten MHK-Analyse nochmals verkleinert werden. Klar ist allerdings, dass der Resistenzanstieg, sofern er denn vorhanden ist, deutlich geringer als im fünften Selektionsschritt ausfallen wird. Über den Zusammenhang eines hyperaktiven CiaRH-Systems und der β -Lactamresistenz ist wenig bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass vor allem die stärkere Expression der csRNAs daran beteiligt ist (Müller, 2011; Schnorpfeil *et al.*, 2013). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz in den Resistenzphänotypen, sowie ein Hinweis auf die Resistenzentstehung in PCPC, könnte in der PBP2x-Menge zu finden sein. In Zuge früherer Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine verringerte PBP2x-Menge in zwei Cefotaxim-resistenten Labormutanten auf den Abbau von PBP2x durch HtrA zurückzuführen ist (Peters, 2013).

Die PBP2x-Derivate der beiden Labormutanten waren durch Aminosäureaustausche modifiziert. Die Daten deuteten stark darauf hin, dass vor allem verändertes PBP2x als Substrat für HtrA fungiert (Peters, 2013). Im Zuge dieser Arbeit konnte in der Mutante PCPC, die ein hyperaktives CiaRH-System, sowie ein niederaffines PBP2x enthält ebenfalls eine verminderte PBP2x-Menge im Vergleich zum Vorgängerstamm (PCP) mittels Westernblotanalysen detektiert werden. Durch *htrA*-Deletion konnte die verminderte PBP2x-Menge wieder gesteigert werden (4.2.4.2). PCP enthält ebenfalls wie PCPC ein niederaffines PBP2x allerdings kein hyperaktives CiaRH-System und demnach auch keine gesteigerte *htrA*-Expression. Ein stärkerer Abbau von PBP2x in PCPC, aufgrund einer gesteigerten *htrA*-Expression wäre demnach denkbar. Da wenig über die natürlichen Substrate von HtrA bekannt ist, ist es schwierig zu sagen, ob dieser Abbau direkt oder indirekt abläuft. Interessant wäre es zu sehen, ob die hier untersuchten Stämme auch unterschiedliche Mengen an den anderen PBPs aufweisen, möglicherweise um die fehlende PBP2x-Menge zu kompensieren. Durch frühere Arbeiten konnten bereits Hinweise drauf erzielt werden, dass in Cefotaxim-resistenten Labormutanten eine verringerte PBP2x-Menge durch eine erhöhte PBP1a-Menge ausgeglichen werden kann (Peters, 2013). Eine Untersuchung des PBP-Profiles von PCPC wäre demnach äußerst interessant.

5.2.2.3 Die Veränderung des sechsten Selektionsschrittes - Die Punktmutation in *pbp2b*

Die Entwicklung der β -Lactamresistenz in *S. pneumoniae* beruht vor allem auf der Modifikation der Targetenzyme, den PBPs (Hakenbeck, 1995). Niederaffine Varianten konnten bei allen sechs PBPs gefunden werden. Die primären Targets vieler β -Lactamantibiotika stellen hierbei PBP2x und PBP2b dar, niederaffine Varianten dieser Proteine sind unablässig für die Entwicklung hochresistenter Stämme. Zwar führt die Veränderung von einem dieser beiden PBPs oft nur zu einer geringfügigen Steigerung des Resistenzniveaus, durch ein zusätzlich niederaffines PBP1a, das als sekundäre Resistenzdeterminante fungiert, kann aber ein sehr hohes Resistenzlevel erreicht werden (Barcus *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1992).

Innerhalb der Transformationsreihe konnte im ersten Selektionsschritt große Teile von PBP2x und im zweiten Selektionsschritt das komplette PBP1a von *S. oralis* Uo5 auf *S. pneumoniae* R6 übertragen werden. Im dritten Selektionsschritt kam es zum Austausch von PBP2b. Hierbei rekombinierten die ersten 1350 bp (450 AS) des Uo5-*pbp2b*, was nur einen Teil der Transpeptidasedomäne (345-670) beinhaltet. Ein Vergleich der PBP2b-Sequenz von R6, Uo5 und PCPCO kann der Abbildung 5.3 entnommen werden.

Die Proteinsequenz des Uo5-PBP2b unterscheidet sich um 12 % von dem, des sensitiven R6 und beinhaltet 81 Substitutionen, 42 von ihnen befinden sich innerhalb der Transpeptidasedomäne. In PCPCCO wurden die ersten 450 Aminosäuren von PBP2b durch Uo5-Sequenz ersetzt. Insgesamt 48 Substitutionen konnten in PCPCCO im Vergleich zu R6 identifiziert werden, die PBP2b-Sequenz von PCPCCO weicht um 7 % von der des sensitiven Wildtyps ab. Unter den zehn Aminosäureaustauschen der Transpeptidasedomäne finden sich auch solche, die bereits in resistenten Pneumokokken-Isolaten beschrieben wurden. Darunter die T₄₄₆A/S-Mutation (in Abbildung 5.3 T₄₄₇A), die sich direkt neben der S₄₄₃SN-Box (in Abbildung 5.3 als S₄₄₄SN-Box gekennzeichnet) befindet, die S₄₁₂P-Substitution, sowie der Austausch von Glutamin zu Glutamat an der Position 438. Alle diese Mutationen wurden bereits in resistenten Pneumokokken-Stämmen gefunden (Grebe und Hakenbeck, 1996; Dowson *et al.*, 1989; Dowson *et al.*, 1993; Smith und Klugman, 1995; Hakenbeck *et al.*, 1998; Ferroni und Berche, 2001; Nagai *et al.*, 2002; du Plessis *et al.*, 2002; Pagliero *et al.*, 2004). Am C-terminalen Ende des Uo5-PBP2b können weitere Substitutionen identifiziert werden, die ebenfalls in hochresistenten Pneumokokkenstämmen beschrieben wurden (du Plessis *et al.*, 2002; Ferroni und Berche, 2001; Hakenbeck *et al.*, 1998; Pagliero *et al.*, 2004, Ramalingam *et al.*, 2013; Jenson *et al.*, 2015). Da sich der ausgetauschte Bereich in PCPCCO einschließlich bis zur Aminosäure 450 erstreckt, spielen diese Mutationen keine Rolle bei der Resistenzentwicklung von PCPCCO.

5. Diskussion

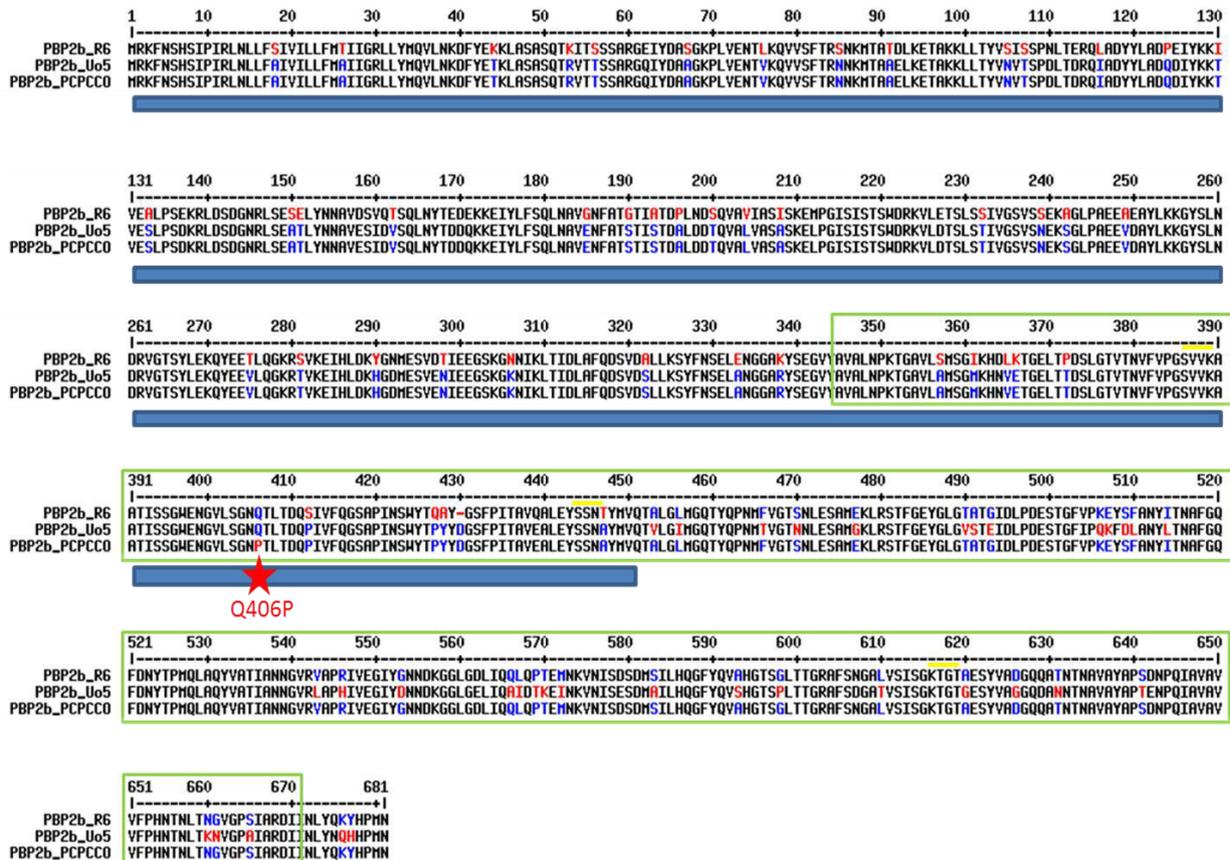


Abbildung 5.3: Vergleich der PBP2b-Proteinsequenz aus R6, Uo5 und PCPCO

Gezeigt ist die Proteinsequenz von PBP2b aus R6, Uo5 und PCPCO. Die Aminosäuren, die die gleiche Sequenz in zwei der drei gezeigten Stämme aufweisen sind blau, Aminosäuresequenzen die nur in einem Stamm vorliegen, sind rot markiert. Der grüne Kasten kennzeichnet die Transpeptidasedomäne von PBP2b. Der blaue Balken symbolisiert den Sequenzbereich, der in PCPCO durch Uo5-Sequenz ersetzt ist. Die Punktmutation in PCPCO (Q406P) ist durch den roten Stern hervorgehoben. Die gelben Balken kennzeichnen die drei konservierten Boxen ($S_{386}VVK$, $S_{443}SN$, $K_{615}TG$; in dieser Abbildung als $S_{386}VVK$, $S_{444}SN$ und $K_{616}TG$ eingezeichnet).

Durch Genomsequenzierung konnte in PCPCO eine Punktmutation innerhalb des Uo5-Sequenzbereiches (a1218c) identifiziert werden, die in einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Prolin an Position 406 resultiert. Die Veränderung befindet sich in der Transpeptidasedomäne und führt zum Austausch einer polaren durch eine unpolare Aminosäure. Zudem gilt Prolin, wie auch Glycin als sogenannter „Helixbrecher“. Da das Stickstoffatom des Prolins nicht mit einem Wasserstoffatom verbunden ist, können keine Wasserstoffbrücken gebildet werden. An dieser Stelle kann es dadurch zu einem Knick oder einer Krümmung innerhalb der Sekundärstruktur des Proteins kommen.

Bei der $Q_{406}P$ -Substitution handelt es sich um die einzige Veränderung, die in PCPCO im Vergleich zum Vorgängerstamm (PCPCC) identifiziert werden konnte und demnach für den Resistenanstieg im sechsten Selektionsschritt verantwortlich sein sollte. Wie aber in 4.2.1.1 bereits erwähnt, konnten

nur 97,01% aller Basenpaare von PCPCCO sequenziert werden. Demnach ist es theoretisch möglich, dass sich innerhalb der Lücken noch weitere Veränderungen befinden, die nicht identifiziert werden konnten. Ein erster Hinweis darauf, dass ausschließlich der Aminosäureaustausch in PBP2b für die Erhöhung des Resistenzniveaus verantwortlich ist, lieferte das MHK-Profil von PCPCCO (4.2.1). Im letzten Selektionsschritt erhöhte sich die Resistenz für Piperacillin und Oxacillin jeweils um den Faktor 1,3. Eine Veränderung der MHK für Cefotaxim konnte nicht festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass wirklich die PBP2b-Veränderung den Resistenzanstieg für Piperacillin und Oxacillin vermittelt, da PBP2b keine Affinität gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation, zu denen auch Cefotaxim gehört, besitzt (Hakenbeck *et al.*, 1987). Weiterhin konnte PCPCCO durch Einbringen der *pbp2b*-Punktmutation in den Vorgängerstamm (PCPCC) nachgestellt werden. Die daraus resultierenden PCPCC-Derivate (PCPCC_{*pbp2b*_PCPCCO_1} und PCPCC_{*pbp2b*_PCPCCO_2}) zeigten die gleiche MHK für Piperacillin wie PCPCCO. Auch im R6-Hintergrund vermittelte die *pbp2b*-Punktmutation einen Resistenzanstieg. Die MHK für Piperacillin verdoppelte sich von 0,03 auf 0,06 µg/ml (4.2.6).

Das Einbringen der PBP2b-Veränderungen aus PCPCCO führte sowohl in PCPCC, wie auch im Wildtyphintergrund zu einer Erhöhung der MHK für Piperacillin. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei *pbp2b* um ein essentielles Gen handelt, war kein direktes Ausschalten und Ersetzen, zum Beispiel über eine Janus-Konstruktion, möglich. Das Arbeiten erfolgte demnach unter Selektionsdruck. Dies birgt immer die Gefahr, dass im Genom unerwünschte Mutationen entstehen, die die Resistenz vermitteln. Ausgeschlossen werden kann dies auch hier nicht, ist aber eher unwahrscheinlich, da zum einen, sowohl bei R6, wie auch PCPCC immer zwei Mutanten untersucht wurden, die die gewünschte Mutation enthielten und diese dann jeweils ein identisches Resistenzniveau aufzeigten. Zum anderen ist PBP2b (Q406P) die einzige Veränderung, die innerhalb des sechsten Selektionsschrittes identifiziert werden konnte und ihre Einführung in den Vorgängerstamm PCPCC erhöhte dessen Resistenz exakt auf den Wert von PCPCCO. Aufgrund dieser Fakten scheint es unwahrscheinlich, dass der Resistenzanstieg nicht durch Q₄₀₆P, sondern durch ungewünschte, nicht identifizierte Mutationen hervorgerufen wurde. Es konnte demnach gezeigt werden, dass eine Resistenzdeterminante, die über horizontalen Gentransfer, eines resistenten Kommensalen auf *S. pneumoniae* übertragen wurde, durch eine sekundäre Mutation, das Resistenzniveau des Rezipienten weiter steigern kann.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Grenzen des horizontalen Gentransfers von *S. oralis* auf *S. pneumoniae* aufgewiesen werden. Es konnte klar gezeigt werden, dass der Resistenzanstieg in den letzten drei Selektionsschritten nicht durch resistente Uo5-Gene, sondern einzig durch Punktmutationen vermittelt wurde. Weitere Transformationsversuche könnten klären, ob eine vollständige Übertragung des Resistenzniveaus, wie im Falle von *S. mitis* auf *S. pneumoniae* nicht auch bei *S. oralis* möglich ist.

Der Resistenzanstieg in den ersten drei Selektionsstufen wurde vor allem durch den Transfer niederaffiner PBPs (PBP2x, PBP1a, PBP2b) vermittelt. Hierbei konnte nur *pbp1a* vollständig von Uo5 auf R6 übertragen werden. Bei Vergleich der Genome von R6 und Uo5 fällt auf, dass Uo5 kein *murN*-Homolog besitzt (Hoskins *et al.*, 2001; Reichmann *et al.*, 2011). In *S. oralis* scheint die Interpeptidbrücke im Gegensatz zu *S. pneumoniae* nur aus einer Aminosäure, L-Alanin, zu bestehen (Todorova *et al.*, 2015). Interessant wäre es, das von Todorova, (2010) durchgeführte Transformationsexperiment zu wiederholen, diesmal allerdings mit einem R6-Derivat, indem zuvor *murN* deletiert wurde. Möglich, dass dieser veränderte genetische Hintergrund die Übertragung weiterer PBPs bzw. die vollständige Übertragung von PBP2x und PBP2b erlaubt. Im Fall von PBP2b, indem nur die ersten 1350 bp (450 AS) des Uo5-*pbp2b* rekombinierten, konnte gezeigt werden, dass sich am C-terminalen Ende des Uo5-PBP2b weitere Substitutionen befinden, die bereits in hochresistenten Pneumokokkenstämmen beschrieben wurden (du Plessis *et al.*, 2002; Ferroni und Berche, 2001; Hakenbeck *et al.*, 1998; Pagliero *et al.*, 2004, Ramalingam *et al.*, 2012; Jenson *et al.*, 2015). Es ist denkbar, dass diese Substitutionen im R6-Hintergrund einen Anstieg der β -Lactamresistenz vermitteln. Neben der Transformation mit chromosomaler DNA könnten auch gezielt die Uo5-PBPs amplifiziert und unter Selektionsdruck in R6 transformiert werden.

6. Literaturverzeichnis

Abi Khattar Z., Rejasse A., Destoumieux-Garzón D., Escoubas J. M., Sanchis V., Lereclus D., Givaudan A., Kallassy M., Nielsen-Leroux C., Gaudriault S. (2009). The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J Bacteriol.* **191(22)**:7063-73

Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. und Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **43**: 1–14.

Alves R., Savageau M. A. (2003). Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function. *Mol Microbiol.* **48(1)**:25-51.

Attali C., Durmort C., Vernet T., Guilmi A. M. (2008). The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun.* **76(11)**: 5350-5356.

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

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

Bartilson M., Marra A., Chistine J, Asundi J. S., Schneider W. P., und Hromockyj A. E. (2001). Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol Microbiol.* **39 (1)**: 126-135.

Becker P., Hakenbeck R., Henrich B. (2008). An ABC transporter of *Streptococcus pneumoniae* involved in susceptibility to vancomycin and bacitracin. *Antimicrob Agents Chemother.* **53(5)**:2034-2041.

Berg S., Edman M., Li L., Wikström M., Wieslander A. (2001). Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. Recognition of a large group of lipid glycosyltransferases in eubacteria and archaea. *J Biol Chem* **276(25)**:22056-22063.

Bogdanov M., Heacock P. N., Dowhan W. (2002). A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.* **21(9)**:2107-2016.

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

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72 (1-2)**: 246-254.

Briese T., Hakenbeck R. (1985). Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem.* **146(2)**:417-27.

- Brundish D. E., Shaw N., Baddiley J. (1965).** The glycolipids from the non-capsulated strain of *Pneumococcus* I-192R, A.T.C.C. 12213. *Biochem J.* **97(1)**:158-65.
- Brundish D. E., Shaw N., Baddiley J. (1967).** The phospholipids of *Pneumococcus* I-192R, A.T.C.C. 12213. Some structural rearrangements occurring under mild conditions. *Biochem J.* **104(1)**:205-211.
- Buelow D. R. und Raivio T. L. (2010).** Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol.* **75(3)**:547-566.
- Bugaeva W. (2013).** Untersuchungen der Regulation der *S. pneumoniae* Gene *spr1875* und *spr1992* durch das CiaRH-Zweikomponentensystem. Forschungspraktikum. Technische Universität Kaiserslautern.
- Bugaeva, W. (2014).** Untersuchung des *Streptococcus pneumoniae* Gens *spr1992* durch das CiaRH-Zwei-Komponentensystem. Vertiefungspraktikum. Technische Universität Kaiserslautern.
- Burne R. A., Wen Z. T., Chen Y. Y., Penders J. E. (1999).** Regulation of expression of the fructan hydrolase gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by induction and carbon catabolite repression. *J Bacteriol.* **181(9)**:2863-2871.
- Cafini F., Del Campo R., Alou L., Sevillano D., Morosini M. I., Baquero F., Prieto J. (2006).** Alterations of the penicillin-binding proteins and *murM* alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **57 (2)**: 224-229.
- Campelo F., McMahon H. T., Kozlov M. M. (2008).** The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys J.* **95(5)**:2325-39.
- Cassone M., Gagne A. L., Spruce L. A., Seeholzer S. H., Sebert M. E. (2012).** The *HtrA* protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. *J Biol Chem.* **287(46)**:38449-38459.
- Carvalho S. M., Kloosterman T. G., Kuipers O. P., Neves A. R. (2011).** CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* **6(10)**:e26707.
- Chalkley L. J. and Koornhof H. J. (1990).** Intra- and inter-specific transformation of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.* **26 (1)**:21-28.
- Chalkley L., Schuster C., Potgieter E. und Hakenbeck R. (1991).** Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett.* **69(1)**: 35-42
- Chastanet A., Prudhomme M., Claverys J. P. und Msadek T. (2001).** Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival *J Bacteriol.* **183(24)**:7295-7307.
- Chen J. D. and Morrison D. A. (1987).** Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol.* **133 (7)**: 1959-1967.
- Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M. und Hakenbeck R. (2007).** Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol* **297(7-8)**: 503-512

- Christiansson A., Eriksson L. E., Westman J., Demel R., Wieslander A. (1985)** Involvement of surface potential in regulation of polar membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii*. *J Biol Chem.* **260(7)**:3984-3990.
- Claverys J. P., Prudhomme M., Mortier-Barrière I., Martin B. (2000)** Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol.* **35(2)**:251-259.
- Claverys, J. P., Prudhomme M. und Martin, B. (2006).** Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 451-75.
- Claverys J. P., Martin B., Polard P. (2009).** The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev.* **33(3)**:643-656
- Collins, L. V., Kristian S. A., Weidenmaier C., Faigle M., Van Kessel, K. P., Van Strijp, J. A., Götz, F., Neumeister, B., and Peschel, A. (2002).** *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* **186**: 214-219.
- Coffey T. J., Daniels M., Mcdougal L. K., Dowson C. G., Tenover F. C., Spratt B. G. (1995).** Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **39 (6)**: 1306-1313.
- Coffey T. J., Dowson C. G., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B. G., Musser J. M. (1991).** Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5 (9)**: 2255-2260.
- 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
- Dawid S., Sebert M. E., 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.
- De Pascale G., Lloyd A. J., Schouten J. A., Gilbey A. M., Roper D. I., Dowson C. G., Bugg T. D. (2008).** Kinetic characterization of lipid II-Ala:alanyl-tRNA ligase(MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using semisynthetic aminoacyl-lipid II substrates. *J Biol Chem.* **283 (50)**: 34571-34579.
- Denapaite D., Chi F., Maurer P., Nolte O. und Hakenbeck R. (2007).** Mechanism of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: targets, gene transfer, and mutations. In *Molecular biology of streptococci*. Hakenbeck, R und Chhatwal, G. S. (Hrsg.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 290-303.
- Denapaite D., Brückner R., Nuhn M., Reichmann P., Henrich B., Maurer P., Schähle Y., Selbmann P., Zimmermann W., Wambutt R., Hakenbeck R. (2010).** The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? *PLoS One.* **5(2)**:e9426.
- Denapaite D., Brückner R., Hakenbeck R., Vollmer W. (2012).** Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist.* **18(3)**:344-58.

- Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J., Dideberg O. (2001).** Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J Biol Chem.* **276 (48)**: 45106-45112.
- Deutscher J., Francke C., Postma P. W. (2006).** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70(4)**:939-1031.
- Dowhan W., Mileykovskaya E., Bogdanov M. (2004).** Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta.* **1666(1-2)**:19-39.
- Dowson C. G., Hutchison A., Brannigan J. A., George R. C., Hansman D., Linares J., Tomasz A., Smith J.M. und Spratt B. G. (1989)** Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(88)22**: 8842-8846
- Dowson C. G., Hutchison A., Woodford N., Johnson A. P., George R. C. und Spratt B. G. (1990).** Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87 (15)**: 5858-5862
- Dowson C. G., Coffey T. J., Kell C. und Whiley R. A. (1993).** Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*, the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **9(3)**: 635-643
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso G., Geyer A., Hartung, T. und von Aulock, S. (2006).** Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **281(45)**: 33849-33859.
- du Plessis M., Bingen E. und Klugman K. P. (2002).** Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **46(8)**: 2349-2357.
- Edman, M., Berg, S., Storm, P., Wikström, M., Vikström, S., Ohman, A., und Wieslander, A. (2003).** Structural features of glycosyltransferases synthesizing major bilayer and non-bilayer-prone membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii* and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **278(10)**: 8420-8428.
- Echenique J. R., Chapuy-Regaud S. und Trombe M. C. (2000).** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of ciaRH and comCDE. *Mol Microbiol.* **36 (3)**:688-696.
- Echenique J. R., Trombe M. C. (2001a).** Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction. *J Bacteriol.* **183(2)**:768-772.
- Echenique J. R., Trombe M. C. (2001b).** Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol.* **183(15)**:4599-4608.
- Egeter O. und Brückner R. (1996).** Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol.* **21(4)**:739-749.
- Eisel, J. (2008).** Bedeutung einzelner Funktionen des *cpoA*-Genclusters für die Empfindlichkeit von *Streptococcus pneumoniae* gegen Piperacillin. Diplomarbeit. Technische Universität Kaiserslautern.

- Escribá P. V., Ozaita A., Ribas C., Miralles A., Fodor E., Farkas T., García-Sevilla J. A. (1997).** Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(21)**:11375-11380.
- Fani F., Brotherton M. C., Leprohon P., Ouellette M. (2013).** Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* **68(8)**:1718-27.
- Feng J., Lupien A., Gingras H., Wasserscheid J., Dewar K., Légaré D., Oulette M. (2009).** Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res.* **19 (7)**: 1214-1223.
- Ferroni A. und Berche P. (2001).** Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children. *J Med Microbiol.* **50(9)**: 828-832.
- Filipe S. R. und Tomasz A. (2000).** Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(9)**: 4891-4896
- Filipe S. R., Severina E., Tomasz A. (2000).** Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **182 (23)**: 6798-6805.
- Filipe S. R., Severina E., Tomasz A. (2001).** Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides. *J Biol Chem.* **276 (43)**: 39618-39628.
- Fischer W. (1988).** Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol.* **29**:233-302.
- Fischer W., Mannsfeld T., Hagen G. (1990).** On the basic structure of poly(glycerophosphate) lipoteichoic acids. *Biochem Cell Biol.* **68(1)**:33-43.
- Fischer W. (2000).** Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol.* **151(6)**:421-427.
- Fischer W., Behr T., Hartmann R., Peter-Katalinić J., Egge H. (1993).** Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem.* **215(3)**:851-857.
- Forler, B. (2014).** Die Regulation des Gens des potentiellen Regulators SPR1992 in *Streptococcus pneumoniae* R6. Bachelorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Frohnweiler K. (2009).** Überexpression und Reinigung von MurM und Untersuchung seiner Rolle bei der Vermittlung von beta Lactam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Garcia-Bustos J. F., Chait B. T., Tomasz A. (1987).** Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem.* **262 (32)**: 15400-15405.
- Garcia-Bustos J. F., Chait B. T. und Tomasz A. (1988).** Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol* **170(5)**: 2143-2147.
- Garcia-Bustos J. F. 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.

- Gardete S., Ludovice A. M., Sobral R. G., Filipe S. R., de Lencastre H. und Tomasz A. (2004).** Role of *murE* in the expression of beta-lactam antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **186(6)**: 1705-1713
- George, N. (2012).** Inducible Expression of *htrA* in *Streptococcus pneumoniae*, Masterarbeit, TU Kaiserslautern
- Ghuysen J. M. (1991).** Serin β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 37-67
- Giammarinaro P., Sicard M., Gasc A. M. (1999).** Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology.* **145 (Pt 8)**:1859-1869.
- 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 penicilli-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev* **66(4)**: 702-738.
- Gorter E, Grendel F. (1925).** ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J Exp Med.* **41(4)**:439-443.
- Grebe T. und Hakenbeck R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(4)**: 829-834
- Grebe T., Paik J., Hakenbeck R. (1997).** A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol.* **179 (10)**: 3342-3349.
- Griffith F. (1928).** The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**: 113-159.
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. und Peschel. A. (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun* **69**: 3423-3436.
- Guenzi E., Gasc A. M., Sicard M. A. und Hakenbeck R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12(3)**: 505-515.
- Guiral, S., Mitchell T. J., Martin B. und Claverys J. P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88(19)**: 8553-8557.
- Haas W., Sublett J., Kaushal D., Tuomanen E. I. (2004).** Revising the role of the pneumococcal *vex-vncRS* locus in vancomycin tolerance. *J Bacteriol.* **186(24)**:8463-71.
- Haas W., Kaushal D., Sublett J., Obert C., Tuomanen E. I.(2005).** Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **187(23)**:8205-8210.

- Hakenbeck R., Briese T. und Ellerbrok H. (1986).** Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem* **157**: 101-106.
- Hakenbeck R., Tornette S., Adkinson N. F. (1987).** Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol.* **133(3)**:755-760.
- Hakenbeck R., Martin C., Dowson C., Grebe T. (1994).** Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J Bacteriol.* **176 (17)**: 5574-5577.
- Hakenbeck R. (1995).** Target mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* **50**: 1121-1127.
- Hakenbeck R., König A., Kern I., Van Der Linden M., Keck W., Billot-Klein D., Legrand R., Schoot B., Gutmann L. (1998).** Acquisition of five high-Mr penicillinbinding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **180 (7)**: 1831-1840.
- Hakenbeck R., Grebe T., Zähler D. und Stock J. B. (1999).** Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33(4)**: 673-678.
- Halfmann A., Hakenbeck R., und Brückner R. (2007a):** A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**: 217-224.
- Halfmann A., Kovács 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., Schnorpfeil A., Müller M., Marx P., Günzler U., Hakenbeck R., Brückner R. (2011).** Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **20(2)**:96-104.
- Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166(4)**:557-80.
- Hardie J. M. und While R. A. (1995).** The genus *Streptococcus* in the genera of lactic acid bacteria. Wood, B. J. B., Holtzapfel W. H. (Hrsg.) Blackie Academic & Professional 55-124.
- Håvarstein L. S., Coomaraswamy G., Morrison D. A. (1995).** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92(24)**: 11140-11144.
- Håvarstein L. S., Martin B., Johnsborg O., Granadel C., Claverys J. P. (2006).** New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* **59(4)**: 1297-307.
- 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., Bertram R. (2011).** Vectors for improved Tet repressor-dependent gradual gene induction or silencing in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* **157(Pt 12)**:3314-23

Henkin T. M., Grundy F. J., Nicholson W. L., Chambliss G. H. (1991). Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol Microbiol.* **5(3)**:575-584.

Hoskins J., Alborn W. E. Jr., Arnold J., Blaszcak L. C., Burgett S., DeHoff B. S., Estrem S. T., Fritz L., Fu D. J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J. S., Khoja H., Kraft A. R., Lagace R. E., LeBlanc D. J., Lee L. N., Lefkowitz E. J., Lu J., Matsushima P., McAhren S. M., McHenney M., McLeaster K., Mundy C. W., Nicas T. I., Norris F. H., O'Gara M., Peery R. B., Robertson G. T., Rockey P., Sun P. M., Winkler M. E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C. A., Baltz R. H., Jaskunas S. R., Rosteck P. R. Jr., Skatrud P. L., Glass J. I. (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* **183(19)**:5709-5717.

Huber F. (2012). Herstellung eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems in Pneumokokken. Forschungspraktikum Technische Universität Kaiserslautern.

Hughes A. H., Hancock I. C., Braddley J. (1973). The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem J.* **132**:83-93.

Hui, F. M., Zhou L., Morrison, D. A. (1995) Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes. *Gene.* **153 (1)**:25-31.

Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J., 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.

Isaac D. D., Pinkner J. S., Hultgren S. J., Silhavy T. J. (2005). The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(49)**:17775-17779.

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

Jensen A., Valdórrsson O., Frimodt-Møller N., Hollingshead S., Kilian M. (2015). Commensal streptococci serve as a reservoir for β -lactam resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **59(6)**:3529-3540.

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 oxidase tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **69 (9)**: 5538-5545

Jorasch P., Wolter F. P., Zähringer U., Heinz E. (1999). A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of ypfP in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. *Mol Microbiol.* **29(2)**:419-30.

Jorasch P., Warnecke D. C., Lindner B., Zähringer U., Heinz E. (2000). Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycosylglycerolipids, glycosylphospholipids, glycosylsphingolipids and glycosylsterols. *Eur J Biochem.* **267(12)**:3770-83.

- Kaysen A. (2012).** The interconnection of genetic competence and the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. Masterarbeit, TU Kaiserslautern.
- Kammerer W., Deuschle U., Gentz R., Bujard H. (1986).** Functional dissection of *Escherichia coli* promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process. *EMBO J.* **5(11)**:2995-3000.
- Kashyap D. R., Wang M., Liu L. H., Boons G. J., Gupta D., Dziarski R. (2011).** Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nat Med.* **2011 17(6)**:676-683.
- Kashyap D. R., Rompca A., Gaballa A., Helmann J. D., Chan J., Chang C. J., Hozo I., Gupta D., Dziarski R. (2014).** Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. *PLoS Pathog.* **10(7)**:e1004280
- Kato A und Groisman E. A. (2004).** Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev.***18(18)**:2302-2313.
- Kaufman B., Kundig D., Distler J. Roseman S. (1965).** Enzymatic synthesis and structure of two glycolipids from type XIV *Pneumococcus*. *Biochem, Biophys. Res. Commun* **18**:312-318.
- Kausmally L., Johnsborg O., Lunde M., Knutsen E. und Håvarstein L. S. (2005).** Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induce cell-lysis. *J. Bacteriol.* **187(13)**: 4338-4345.
- Kell C. M., Sharma U. K., Dowson C. G., Town C., Balganesch T. S. und Spratt B. G. (1993).** Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **106(2)**: 171-175.
- Kiriukhin M. Y., Debabov D. V., Shinabarger D. L., Neuhaus F. C. (2001).** Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of YpfP, the diglucosyldiacylglycerol synthase. *J Bacteriol.* **183(11)**:3506-14.
- Kilian M., Mikkelsen L. Henrichesen J. (1989).** Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov., and emended description of *Streptococcus sanguinis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridgeand Sneath 1982) and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int J Syst Bacteriol* **39**: 471-484.
- Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., Havarstein L. S., Bek-Thomsen M., Tettelin H., Sorensen U. B. (2008).** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One.* **3 (7)**: e2683.
- Kim D. Y. und Kim K. K. (2005).** Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. 266-274. *J Biochem Mol Biol.* **38(3)**: 266-74.
- Kirsch, C. (2011).** Evaluierung des regulatorischen Potentials der kleinen, von CiaR regulierten RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit. Technische Universität Kaiserslautern.
- Kilpper-Bälz R., Wenzig P. Schleifer K. H. (1985).** Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis*. *Int J Syst Bacteriol* **35**: 482-488.

- König L., (2013).** Die Rolle des Gens spr1992 bei der β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae*. Forschungspraktikum. Technische Universität Kaiserslautern.
- Kovács M., Halfmann A., Fedtke I., Heintz M., Peschel A., Vollmer W., Hakenbeck R. Brückner R. (2006).** A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **188(16)**: 5797-5805.
- Kovács M. (2009).** Die kleinen nichtcodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation Technische Universität Kaiserslautern.
- Kowalko J. E. und Sebert M. E. (2008).** The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization. *Infect Immun.* **76(7)**:3131-40.
- Krauß J., van der Linden M., Grebe T. Hakenbeck R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP-targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resist.* **2**: 183-186.
- Lambert P.A., Hancock I. C. Braddley J. (1975).** Influence of Alanyl Ester Residues on the Binding of Magnesium Ions to Teichoic Acids. *Biochem J.* **151**: 671-676
- Lange R., Wagner C., de Saizieu A., Flint N., Molnos J., Stieger M., Caspers P., Kamber M., Keck W. 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.
- Lau G. W., Haataja S., Lonetto M., Kensit S. E., Marra A., Bryant A. P., McDevitt D., Morrison D. A. Holden D. W. (2001).** A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol.* **40(3)**:555-71
- Laub M. T. und Goulian M. (2007).** Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**:121-145.
- Laux, A. (2014).** Die kleinen nicht kodierenden csRNAs im CiaR-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*: Ihre Rolle in der β -Laktamresistenz und Kompetenz. Dissertation, TU Kaiserslautern
- Laux A., Sexauer A., Sicaselvarajah D., Kaysen A., Brückner R. (2015).** Control of competence by related non-coding csRNAs in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Front Genet.* **6**:246.
- 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, 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)**:1337-48.
- Laemmli U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 680-685.
- Li L., Storm P., Karlsson O. P., Berg S., Wieslander A. (2003).** Irreversible binding and activity control of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* at an anionic lipid bilayer surface. *Biochemistry.* **42(32)**:9677-9686.

- Lindblom G., Brentel I., Sjölund M., Wikander G., Wieslander A. (1986).** Phase equilibria of membrane lipids from *Acholeplasma laidlawii*: importance of a single lipid forming nonlamellar phases. *Biochemistry*. **25(23)**:7502-7510.
- Lloyd A. J., Gilbey A. M., Blewett A. M., De Pascale G., El Zoeiby A., Levesque R. C., Catherwood A. C., Tomasz A., Bugg T. D., Roper D. I., Dowson C. G. (2008).** Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *J Biol Chem*. **283 (10)**: 6402-6417.
- López C S, Alice A F, Heras H, Rivas E A, Sánchez-Rivas C (2006).** Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology*. **152(Pt 3)**:605-16.
- Lukat G. S., McCleary W. R., Stock A. M., Stock J. B. (1992).** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(2)**:718-22.
- Marmur J. (1961).** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol*. **3**: 202-218.
- Martin B., Prudhomme M., Alloing G., Granadel C., Claverys J. P. (2000).** Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. **38(4)**:867-78.
- Marx P. (2013)** Die Steuerung der Aktivität des Response Regulators CiaR des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, TU Kaiserslautern
- Marx P., Meiers M. und Brückner R. (2015):** Activity of the response regulator CiaR in mutants of *Streptococcus pneumoniae* R6 altered in acetyl phosphate production. *Front Microbiol*. **5**:772.
- Mascher T., Zähner D., Merai M., Balmelle N., de Saizieu A. B., Hakenbeck R. (2003).** The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol* **185(1)**: 60-70.
- Mascher T., Heintz M., Zähner D., Merai M., Hakenbeck R. (2006).** The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in β -lactam resistance. *J Bacteriol* **188(5)**:1959-1968.
- McBride S. M., Sonenshein A. L. (2011)** The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* **157(Pt 5)**:1457-65.
- McKessar S. J., Hakenbeck R. (2007).** The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol*. **189(4)**:1342-1350
- Mengin-Lecreux D., Blanot D., van Heijenoort J. (1994).** Replacement of diaminopimelic acid by cystathionine or lanthionine in the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **176**: 4321-4327.
- Mengin-Lecreux D., Falla T., Blanot D., van Heijenoort J., Adams D. J., Chopra I.(1999).** Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramoyl- L-alanyl-Dglutamate:L-lysine ligase in *Escherichia coli* and effects on peptidoglycan biosynthesis and cell growth. *J Bacteriol*. **181(19)**: 5909-14.
- Meiers, M. (2011).** Piperacillin-resistente Labormutanten von *Streptococcus pneumoniae*: Beteidigung von Nicht-PBP-Genen. Diplomarbeit. Technische Universität Kaiserslautern.

- Meiers M., Volz C., Eisel J., Maurer P., Henrich B., Hakenbeck R. (2014).** Altered lipid composition in *Streptococcus pneumoniae* *cpoA* mutants. *BMC Microbiol.* **14**:12
- Miller J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. New York. Cold spring Harbor Press:
- Mishra N. N., Bayer A. S., Tran T. T., Shamoo Y., Mileykovskaya E., Dowhan W., Guan Z., Arias C. A. (2012)** Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. *PLoS One.* **7(8)**:e43958.
- Mitchell, T. J. (2003).** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* **1(3)**: 219-355.
- Mitrophanov A. Y. und Groisman E. A. (2008).** Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* **22(19)**:2601-2611.
- Morlot C., Noirclerc-Savoye M., Zapun A., Dideberg O. und Vernet T. (2004).** The D,D-carboxypeptidase PBP3 organize the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **51(6)**: 1641-1648.
- Moscoso M., Domenech M., García 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(4)**:1052-1064.
- Mosser J. L., Tomasz A. (1970).** Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem.* **245(2)**:287-298.
- Müller M., Marx P., Hakenbeck R., 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
- Müller M (2011).** Die Regulation des Zweikomponentensystems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* und die phänotypischen Konsequenzen, Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1992).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* **24**:17-27.
- Muñoz R., Coffey T. J., Daniels M., Dowson C. G., Laible G., Casal J., Hakenbeck R., Jacobs M., Musser J. M., Spratt B. G. (1991).** Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J infect Dis.* **164(2)**: 302-306.
- Muñoz R., Dowson C. G., Daniels M., Coffey T.J., Martin C., Hakenbeck R., Spratt B. G. (1992).** Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **6(17)**: 2461-2465.
- Nagai K., Davies T. A., Jacobs M. R., Appelbaum P. C. (2002).** Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(5)**: 1273-1280.
- Neuhaus F. C. und Braddley, J. (2003).** A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl teichoic acid in gram-positives Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67(4)**: 686-723.

- Novak R., Henriques B., Charpentier E., Normark S., Tuomanen E. (1999).** Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*. **399(6736)**:590-593.
- Novak R., Charpentier E., Braun J. S., Tuomanen E. (2000).** Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell*. **5(1)**:49-57.
- Osterberg F., Rilfors L., Wieslander A., Lindblom G., Gruner S. M. (1995).** Lipid extracts from membranes of *Acholeplasma laidlawii* A grown with different fatty acids have a nearly constant spontaneous curvature. *Biochim Biophys Acta* **1257(1)**:18-24.
- Ottolenghi E. und Hotchkiss R. D. (1962).** Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med*. **116** 491-519.
- Pagliero E., Chesnel L., Hopkins J., Croizé J., Dideberg O., Vernet T., Di Guilmi A. M. (2004).** Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. **48(5)**:1848-1855.
- Pasteur L. (1881):** Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de l'arage. *Bull Acad Méd* **10**: 94-103.
- Pedersen C. M., Figueroa-Perez I., Boruwa J., Lindner B., Ulmer A. J., Zähringer U., Schmidt R. R. (2010).** Synthesis of the core structure of the lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae*. *Chemistry*. **16(42)**:12627-12641.
- Perego M. und Brannigan J. A. (2001).** Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides*. **22(10)**:1541-1547.
- Pericone C. D., Park S., Imlay J. A., Weiser J. N. (2003).** Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J Bacteriol*. **185(23)**:6815-6825.
- Peschel A., Otto M., Jack R. W., Kalbacher H., Jung G., Götz F. (1999).** Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*. **274(13)**:8405-8410.
- Peschel A., Jack R. W., Otto M., Collins L. V., Staubitz P., Nicholson G., Kalbacher H., Nieuwenhuizen W. F., Jung G., Tarkowski A., van Kessel K. P., van Strijp J. A. (2001)** *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J Exp Med*. **193(9)**:1067-76.
- Peters K (2013).** Der Abbau des essentiellen Penicillin-Bindeprotein 2x in *Streptococcus pneumoniae* durch die Serinprotease HtrA, Dissertation, TU Kaiserslautern
- Peterson S. N., Sung C. K., Cline R., Desai B. V., Snerud E. C., Luo P., Walling J., Li H., Mintz M., Tsegaye, G., Burr P. C., Do Y., Ahn S., Gilbert J., Fleischmann R. D., Morrison D. A. (2004).** Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol*. **51(4)**: 1051-1070.
- Pestova E. V., Håvarstein L. S., Morrison D. A. (1996).** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21(4)**: 853-862.

- Piñas G. E., Cortes P. R., Orio A. G., Echenique J. (2008).** Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. **154(Pt 5)**:1300-1308.
- Potgieter E. und Chalkley L. J. (1991).** Reciprocal transfer of penicillin resistance genes between *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitior* and *Streptococcus sanguis*. *J Antimicrob Chemother*. **28(3)**: 463-465.
- Pribyl T, Moche M, Dreisbach A, Bijlsma J J, Saleh M, Abdullah M R, Hecker M, van Dijl J M, Becher D, Hammerschmidt S. (2014).** Influence of impaired lipoprotein biogenesis on surface and exoproteome of *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res*. **13(2)**:650-667.
- Ramalingam J., Vennila J., Subbiah P. (2013).** Computational studies on the resistance of penicillin-binding protein 2B (PBP2B) of wild-type and mutant strains of *Streptococcus pneumoniae* against β -lactam antibiotics. *Chem Biol Drug Des*. **82(3)**:275-289.
- Ramos-Montañez S., Tsui H. C., Wayne K. J., Morris J. L., Peters L. E., Zhang F., Kazmierczak K. M., Sham L. T., Winkler M. E. (2008).** Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. **67(4)**:729-746.
- Reichmann P., König A., Liñares J., Alcaide F., Tenover F. C., McDougal L., Swidsinski S., Hakenbeck R. (1997).** A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **176(4)**: 1001-1012.
- Reichmann P., Nuhn M., Denapaite D., Brückner R., Henrich B., Maurer P., Rieger M., Klages S., Reinhard R., Hakenbeck R. (2011).** Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *Bacteriol*. **193(11)**:2888-9.
- Robertson G. T., Zhao J., Desai B. V., Coleman W. H., Nicas T. I., Gilmour R., Grinius L., Morrison D. A., Winkler M. E. (2002).** Vancomycin tolerance induced by erythromycin but not by loss of *vncRS*, *vex3*, or *pep27* function in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. **184(24)**:6987-7000.
- Rogers P. D., Liu T. T., Barker K. S., Hilliard G. M., English B. K., Thornton J., Swiatlo E., McDaniel L. S. (2007).** Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J Antimicrob Chemother*. **59(4)**:616-626.
- Salles C., Creancier L., Claverys J. P., Mejean V. (1992).** The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20(22)**: 6103.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989).** *Molecular Cloning, a laboratory manual* (2nd ed.), CSH Press, New York.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74(12)**:5463-7
- Sauerbier J., Maurer P., Rieger M., Hakenbeck R. (2012).** *Streptococcus pneumoniae* R6 interspecies transformation: genetic analysis of penicillin resistance determinants and genome-wide recombination events. *Mol Microbiol*. **86(3)**:692-706.
- Scharff L. B., Childs L., Walther D., Bock R. (2011)** Local absence of secondary structure permits translation of mRNAs that lack ribosome-binding sites. *PLoS Genet*. **7(6)**:e1002155.

- Schnorpfeil A., Kranz M., Kovács M., Kirsch C., Gartmann J., Brunner I., Bittmann S., Brückner R (2013).** Target evaluation of the non-coding csRNAs reveals a link of the two-component regulatory system CiaRH to competence control in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol Microbiol.* **89(2)**:334-49.
- Sebert M. E., Palmer L. M., Rosenberg M. Weiser J. N. (2002).** Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **70(8)**: 4059-4067.
- Sebert M. E., Patel K. P., Plotnick M., 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., Tomasz A. (1992).** Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **174(15)**: 5152-5155.
- Severin A. und Tomasz A. (1996).** Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **178(1)**: 168-174.
- Severin A., Figueiredo A. M., Tomasz A. (1996).** Separation of abnormal cell wall composition from penicillin resistance through genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **178(7)**: 1788-1792.
- Seo H. S., Cartee R. T., Pritchard D. G., Nahm M. H. (2008).** A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologie inconsistencies of the current model. *J. Bacteriol.* **190(7)**: 2379-2387.
- Sexauer, A. (2014).** Die Auswirkung des Zweikomponentensystems CiaRH auf die Transkription der Gene *spr0040* und *spr0091* von *Streptococcus pneumoniae* R6 und die Resistenz gegenüber Fosfomycin. Forschungspraktikum. Technische Universität Kaiserslautern.
- Shaw N. (1970).** Bacterial glycolipids. *Bacteriol Rev.* **34(4)**:365-77
- Sicard A. M. (1964).** A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformations at the *amiA* locus. *Genetics* **50**: 31-44.
- Sibold C. Henrichsen J., König A., Martin C., Chalkley L. Hakenbeck R. (1994).** Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol.* **12(6)**: 1013-1023.
- Skórko-Glonek J., Wawrzynów A., Krzewski K., Kurpierz K., Lipińska 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.
- Smith A. M. und Klugman K. P. (2001).** Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(8)**: 2393-2396.
- Smith A. M. und Klugman K. P. (1995).** Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(4)**:859-867.

- Song J. H., Ko K. S., Lee J. Y., Baek J. Y., Oh W. S., Yoon H. S., Jeong J. Y., Chun J. (2005).** Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol. Cells*, **19(3)**:365-374.
- Spellerberg B., Cundell D. R., Sandros J., Pearce B. J., Idanpaan-Heikkila I., Rosenow C., Masure H. R. (1996).** Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **19(4)**:803-813.
- Stallkamp I., Dowhan W., Altendorf K., Jung K. (1999).** Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **172(5)**: 295-302.
- Steinmoen H., Teigen A., Håvarstein L. S. (2003).** Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J. Bacteriol.* **185**: 7176-7183.
- Sternberg G. M. (1882).** A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. John Hopkins University. *Studies from the biological laboratory*, **2(2)**:183-200.
- Stevens K. E., Chang D., Zwack E. E., Sebert M. E. (2011).** Competence in *Streptococcus pneumoniae* is regulated by the rate of ribosomal decoding errors. *MBio.* **2(5)**. pii: e00071-11.
- Strancar K., Boniface A., Blanot D., Gobec S. (2007).** Phosphinate inhibitors of UDPN-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: L-lysine ligase (MurE). *Arch Pharm (Weinheim)*.**340(3)**: 127-134.
- Tatituri R. V., Brenner M. B., Turk J., Hsu F. F. (2012).** Structural elucidation of diglycosyl diacylglycerol and monoglycosyl diacylglycerol from *Streptococcus pneumoniae* by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *J Mass Spectrom.* **47(1)**:115-123.
- Theilacker C., Sanchez-Carballo P., Toma., Fabretti F, Sava I., Kropec A., Holst O., Huebner J. (2009).** Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol.* **71(4)**:1055-1069.
- Theilacker C., Sava .I, Sanchez-Carballo P., Bao Y., Kropec A., Grohmann E., Holst O., Huebner J. (2011).** Deletion of the glycosyltransferase *bgsB* of *Enterococcus faecalis* leads to a complete loss of glycolipids from the cell membrane and to impaired biofilm formation. *BMC Microbiol.* **11**:67.
- Theilacker C., Diederich A. K., Otto A., Sava I. G., Wobser D., Bao Y., Hese K., Broszat M., Henneke P., Becher D., Huebner J. (2015).** *Enterococcus faecalis* Glycolipids Modulate Lipoprotein-Content of the Bacterial Cell Membrane and Host Immune Response. *PLoS One.* **10(7)**:e0132949
- 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.
- Todorova, K. (2010).** β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus spp.*: Eine neue Resistenzdeterminante *murE*. Dissertation. Technische Universität Kaiserslautern
- Todorova K., Maurer P., Rieger M., Becker T, Bui N. K., Gray J., Vollmer W., Hakenbeck R. (2015).** Transfer of penicillin resistance from *Streptococcus oralis* to *Streptococcus pneumoniae* identifies *murE* as resistance determinant. *Mol Microbiol.* **97(5)**:866-880.

- TOMASZ A., HOTCHKISS R. D. (1964)** REGULATION OF THE TRANSFORMABILITY OF PNEUMOCOCCAL CULTURES BY MACROMOLECULAR CELL PRODUCTS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **51**:480-487.
- Tomasz A. (1968).** Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **59(1)**: 86-93.
- Tomasz A. (1979).** The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol.***33** 113-137.
- Tran T. D., Kwon H. Y., Kim E. H., Kim K. W., Briles D. E., Pyo S., Rhee D. K. (2011).** Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **55(6)**:2714-2728.
- Trieu-Cuot P. und Courvalin P. (1983).** Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5-aminoglycoside phosphotransferase type III, 331-341.
- Tsui H. C., Mukherjee D., Ray V. A., Sham L. T., Feig A. L., Winkler M. E. (2010).** Identification and characterization of noncoding small RNAs in *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J Bacteriol.* **192(1)**:264-79.
- Vollmer W. (2007).** Structure and Biosynthesis of the pneumococcal cell wall. In *Molecular Biology of Streptococci* (ed R. Hakenbeck and S. Chhatwal), Horizon Bioscience, Wymondham, U. K.
- Volz (2008).** Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie Piperacillin-resistenter Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Wandra, R. (2010).** Tetracyclin induzierter Promotor für *S. pneumoniae*. Forschungspraktikum. Technische Universität Kaiserslautern.
- Wanner B. L. (1992).** Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol.* **174(7)**:2053-2058.
- Wecke J., Madela K., Fischer W. (1997).** The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility of methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 2953-2960.
- Weber B., Ehlert K., Diehl A., Reichmann P., Labischinski H., Hakenbeck R. (2000).** The *fib* locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett.* **188(1)**: 81-85.
- Ween O., Gaustad P., Håvarstein L. S. (1999)** Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **33(4)**:817-827.
- Whiley R. A., Beighton D. (1998).** Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* **13(4)**:195-216.
- Wieslander A., Rilfors L., Lindblom G. (1986)** Metabolic changes of membrane lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* by hydrocarbons, alcohols, and detergents: arguments for effects on lipid packing. *Biochemistry.* **25(23)**:7511-7517.

- Wikström M., Kelly A. A., Georgiev A., Eriksson H. M., Klement M. R., Bogdanov M., Dowhan W., Wieslander A. (2009).** Lipid-engineered *Escherichia coli* membranes reveal critical lipid headgroup size for protein function. *J Biol Chem.*, **284(2)**:954-65.
- Wolfe A. J. (2005).** The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69(1)**:12-50.
- Wolfe A. J. (2010).** Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* **13(2)**:204-209.
- Yamamoto K., Hirao K., Oshima T., Aiba H., Utsumi R., Ishihama A. (2005).** Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **280(2)**:1448-56
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Speed T. P. (2001).** Normalization for cDNA microarray data. *Microarrays: Optical Technologies and Informatics.* **4266** 141-152.
- Yeagle P. L. (1989).** Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* **3(7)**:1833-1842.
- Zähner D., Kaminski K., van der Linden M., Mascher T., Merai M., Hakenbeck R. (2002).** The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 211-216.
- Zhang J. R., Idanpaan-Heikkilä I., Fischer W., Tuomanen E. I. (1999).** Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol. Microbiol.* **31(5)**: 1477-1488.
- Zhang W., Bogdanov M., Pi J., Pittard A. J., Dowhan W. (2003).** Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. *J Biol Chem.* **278(50)**:50128-50135.
- Zhang W., Campbell H. A., King S. C., Dowhan W. (2005).** Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the gamma-aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **280(28)**:26032-26038.
- Zhang Y. M., Rock C. O. (2008).** Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **6(3)**:222-233.
- Zhao G., Meier T. I., Kahl S. D., Gee K. R., Blaszcak L. C. (1999).** BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* **43 (5)**: 1124-1128.
- Zhao G., Yeh W. K., Carnahan R. H., Flokowitsch J., Meier T. I., Alborn W. E., Jr., Becker G. W., Jaskunas S. R. (1997).** Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol.* **179 (15)**: 4901-4908.
- Zheng X., Hu G. Q., She Z. S., Zhu H. (2011).** Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics.* **12**:361.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutanten P104

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P-Wert	Transkriptomverhältnis P104/R6
<i>spr0097</i>		Hypothetical protein	0,00	0,07
<i>spr0098</i>		Hypothetical protein	0,00	0,01
<i>spr0099</i>		ABC transporter membrane-spanning permease - amino acid transport	0,00	0,00
<i>spr0103</i>	<i>argH</i>	Arginine succinate lyase	0,02	0,21
<i>spr0104</i>		Hypothetical protein	0,00	0,02
<i>spr0105</i>		Transporter, truncation	0,00	0,01
<i>spr0106</i>		Transporter, truncation	0,00	0,00
<i>spr0107</i>		Hypothetical protein	0,00	0,00
<i>spr0108</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,00
<i>spr0109</i>		Hypothetical protein	0,00	0,01
<i>spr0141</i>		Hypothetical protein	0,00	3,66
<i>spr0144</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,58
<i>spr0276</i>	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,00	0,16
<i>spr0277</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,15
<i>spr0278</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,18
<i>spr0279</i>	<i>bglG</i>	Transcription antiterminator BglG family	0,00	0,22
<i>spr0280</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,33
<i>spr0281</i>		Hypothetical protein	0,00	0,27
<i>spr0307</i>	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	0,00	3,97
<i>spr0369</i>	<i>dagA</i>	D-alanine glycine permease	0,00	3,90
<i>spr0469</i>		Conserved hypothetical protein, truncation	0,00	0,27
<i>spr0470</i>		Hypothetical protein	0,00	0,23
<i>spr0471</i>		Hypothetical protein	0,00	0,25
<i>spr0472</i>	<i>blpY</i>	BlpY protein	0,00	0,26
<i>spr0524</i>	<i>vex1</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,00	8,71
<i>spr0525</i>	<i>vex2</i>	ABC transporter ATP-binding protein - Pep export	0,00	5,16
<i>spr0526</i>	<i>vex3</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,00	7,53
<i>spr0639</i>	<i>copY</i>	COPAB ATPases metal-fist type repressor	0,00	4,52
<i>spr0694</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	3,41
<i>spr0914</i>	<i>hemH</i>	Ferrochelataze	0,00	3,49
<i>spr1238</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,01	3,01
<i>spr1309</i>		Hypothetical protein	0,03	4,56
<i>spr1536</i>	<i>nana</i>	Sialidase A precursor (neuraminidase A)	0,05	138,33
<i>spr1545</i>		Hypothetical protein	0,00	0,25
<i>spr1546</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	0,25

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P-Wert	Transkriptomverhältnis P104/R6
<i>spr1547</i>		Hypothetical protein	0,00	0,21
<i>spr1548</i>		Hypothetical protein	0,00	0,32
<i>spr1549</i>		Hypothetical protein	0,00	0,27
<i>spr1559</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	3,37
<i>spr1568</i>	<i>scrB</i>	Sucrose-6-phosphate hydrolase	0,03	4,73
<i>spr1712</i>	<i>msmE</i>	ABC transporter substrate-binding protein - multiple sugars	0,00	4,22
<i>spr1730</i>		Hypothetical protein	0,00	11,28
<i>spr1731</i>		Hypothetical protein	0,00	4,88
<i>spr1766</i>		Hypothetical protein	0,01	3,67
<i>spr1837</i>	<i>adhE</i>	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	0,00	3,20
<i>spr1916</i>	<i>malP</i>	Maltodextrin phosphorylase	0,05	4,11
<i>spr1966</i>		Conserved hypothetical protein	0,01	3,85
<i>spr1996</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,16

Tabelle 7.2: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutanten P106

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P- Wert	Transkriptverhältnis P106/R6
<i>spr0043</i>	<i>comA</i>	Transport ATP-binding protein ComA	0,03	3,88
<i>spr0044</i>	<i>comB</i>	Transport protein ComB	0,00	4,29
<i>spr0047</i>	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl transferase	0,00	3,96
<i>spr0048</i>	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazole synthetase	0,00	12,24
<i>spr0049</i>	<i>purN</i>	5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1	0,03	4,41
<i>spr0050</i>	<i>vanZ</i>	Teicoplanin resistance protein	0,00	8,31
<i>spr0051</i>	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyl transferase	0,00	4,50
<i>spr0083</i>		ABC transporter solute binding protein - sugar transport	0,00	4,99
<i>spr0097</i>		Hypothetical protein	0,00	0,08
<i>spr0102</i>	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	0,00	0,00
<i>spr0104</i>		Hypothetical protein	0,00	0,14
<i>spr0105</i>		Transporter, truncation	0,00	0,03
<i>spr0106</i>		Transporter, truncation	0,00	0,01
<i>spr0107</i>		Hypothetical protein	0,05	0,23
<i>spr0108</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,03
<i>spr0109</i>		Hypothetical protein	0,02	0,03
<i>spr0110</i>		Hypothetical protein	0,03	0,15
<i>spr0132</i>		Degenerate transposase (orf2)	0,02	4,34
<i>spr0133</i>		Degenerate transposase (orf2)	0,02	4,46
<i>spr0159</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	5,85
<i>spr0221</i>		ABC transporter membrane-spanning permease - iron transport	0,00	4,11
<i>spr0276</i>	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,00	0,11
<i>spr0277</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,15

7. Anhang

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P- Wert	Transkriptverhältnis P106/R6
<i>spr0278</i>	<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,27
<i>spr0279</i>	<i>bglG</i>	Transcription antiterminator BglG family	0,00	0,26
<i>spr0280</i>	<i>PTS-EII</i>	Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,20
<i>spr0281</i>		Hypothetical protein	0,00	0,14
<i>spr0282</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,24
<i>spr0286</i>	<i>hysA</i>	Hyaluronate lyase precursor (hyaluronidase/hyase)	0,01	3,28
<i>spr0288</i>	<i>kdgK</i>	2-keto-3-deoxygluconate kinase	0,01	3,57
<i>spr0291</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	8,08
<i>spr0292</i>	<i>ugl</i>	Unsaturated glucuronyl hydrolase	0,02	11,43
<i>spr0307</i>	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	0,00	3,35
<i>spr0314</i>	<i>cps2A</i>	The type 2 capsule locus of <i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,00	0,32
<i>spr0328</i>		Conserved hypothetical protein	0,01	3,02
<i>spr0440</i>		Hypothetical protein	0,00	3,82
<i>spr0447</i>	<i>xerD</i>	Integrase/recombinase	0,00	0,31
<i>spr0448</i>	<i>hsdS</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease chain S	0,00	0,33
<i>spr0468</i>		Conserved hypothetical protein, truncation	0,00	0,33
<i>spr0469</i>		Conserved hypothetical protein, truncation	0,00	0,28
<i>spr0470</i>		Hypothetical protein	0,00	0,23
<i>spr0471</i>		Hypothetical protein	0,00	0,20
<i>spr0498</i>		Degenerate transposase (orf1)	0,03	3,63
<i>spr0524</i>	<i>vex1</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,00	6,04
<i>spr0525</i>	<i>vex2</i>	ABC transporter ATP-binding protein - Pep export	0,00	3,71
<i>spr0526</i>	<i>vex3</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,00	4,36
<i>spr0545</i>	<i>ABC-SBP</i>	ABC transporter substrate-binding protein - glutamine transport/Major cell binding factor precursor	0,00	3,25
<i>spr0575</i>	<i>ccdA</i>	Cytochrome c-type biogenesis protein	0,02	4,71
<i>spr0612</i>		Degenerate transposase	0,01	6,84
<i>spr0621</i>		ABC transporter substrate-binding protein - unknown substrate, truncation	0,00	7,28
<i>spr0623</i>	<i>glnP</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - glutamine transport	0,00	4,52
<i>spr0632</i>	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - cobalt or other cation transport	0,01	6,93
<i>spr0633</i>		Conserved hypothetical protein	0,02	5,79
<i>spr0635</i>		Hypothetical protein	0,00	15,04
<i>spr0648</i>		Sodium-dependent transporter	0,00	4,55
<i>spr0874</i>		Hypothetical protein	0,02	0,32
<i>spr0881</i>	<i>coiA</i>	Competence protein	0,00	3,94
<i>spr0962</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,27
<i>spr1077</i>		Function unknown, truncation	0,01	3,81
<i>spr1209</i>		Hypothetical protein	0,01	3,51
<i>spr1211</i>	<i>rplL</i>	50S Ribosomal protein L12	0,05	0,32

7. Anhang

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P- Wert	Transkriptverhältnis P106/R6
<i>spr1238</i>	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	3,41
<i>spr1296</i>		Hypothetical protein	0,04	8,92
<i>spr1324</i>	<i>apbE</i>	Thiamine biosynthesis lipoprotein	0,00	3,15
<i>spr1347</i>		Hypothetical protein	0,04	4,05
<i>spr1350</i>		Degenerative transposase	0,01	4,91
<i>spr1420</i>		Hypothetical protein	0,01	3,70
<i>spr1468</i>		Conserved hypothetical protein	0,01	4,54
<i>spr1482</i>		Hypothetical protein	0,02	4,08
<i>spr1532</i>		ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport	0,00	3,22
<i>spr1536</i>	<i>nanA</i>	Sialidase A precursor (neuraminidase A)	0,00	3,33
<i>spr1545</i>		Hypothetical protein	0,00	0,32
<i>spr1558</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,57
<i>spr1559</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	4,77
<i>spr1560</i>		Hypothetical protein	0,00	3,90
<i>spr1622</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,31
<i>spr1667</i>	<i>galT</i>	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	0,00	4,64
<i>spr1674</i>		Conserved hypothetical protein	0,01	7,25
<i>spr1683</i>		UDP-galactose 4-epimerase, truncation	0,03	19,51
<i>spr1700</i>	<i>treR</i>	Trehalose operon transcriptional repressor	0,00	7,81
<i>spr1710</i>	<i>msmG</i>	ABC transporter membrane spanning permease - multiple sugars	0,00	11,22
<i>spr1711</i>	<i>msmF</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - multiple sugars	0,00	10,39
<i>spr1729</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,57
<i>spr1730</i>		Hypothetical protein	0,00	3,58
<i>spr1731</i>		Hypothetical protein	0,00	3,13
<i>spr1735</i>		ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate, truncation	0,01	7,40
<i>spr1753</i>		Hypothetical protein	0,02	0,28
<i>spr1806</i>		Hypothetical protein	0,04	0,23
<i>spr1845</i>	<i>sga</i>	Hexulose-6-phosphate isomerase	0,00	4,54
<i>spr1846</i>	<i>sgH</i>	Hexulose-6-phosphate synthase (HumpS)	0,00	5,46
<i>spr1849</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,05	3,04
<i>spr1901</i>		Hypothetical protein	0,00	5,62
<i>spr1932</i>		Conserved hypothetical protein	0,02	9,22
<i>spr1946</i>		Degenerate transposase (orf1)	0,01	10,87
<i>spr1948</i>		Hypothetical protein	0,03	5,23
<i>spr1949</i>		Hypothetical protein	0,01	5,20
<i>spr1950</i>		Conserved hypothetical protein	0,02	8,54
<i>spr1951</i>		Conserved hypothetical protein	0,01	93,99
<i>spr1952</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	5,20

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P- Wert	Transkriptverhältnis P106/R6
<i>spr1954</i>		Hypothetical protein	0,00	3,62
<i>spr1985</i>		Transposase, uncharacterized, truncation	0,00	9,76
<i>spr2013</i>	<i>comFA</i>	Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases	0,00	7,66
<i>spr2016</i>		Transposase, uncharacterized, truncation	0,01	3,38

Tabelle 7.3: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutanten R6 Δ *cpoA*

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domänen	P-Wert	Transkriptverhältnis R6 Δ <i>cpoA</i> /R6
<i>spr0060</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component	0,01	3,14
<i>spr0081</i>		ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport	0,00	3,83
<i>spr0082</i>		ABC transporter membrane spanning permease - sugar transport	0,00	5,65
<i>spr0083</i>		ABC transporter solute binding protein - sugar transport	0,00	9,75
<i>spr0101</i>		ABC transporter solute-binding protein - amino acid transport	0,01	0,31
<i>spr0276</i>	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	0,00	0,04
<i>spr0277</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,05
<i>spr0278</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,21
<i>spr0279</i>	<i>bglG</i>	Transcription antiterminator BglG family	0,00	0,20
<i>spr0280</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,21
<i>spr0282</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	0,19
<i>spr0307</i>	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	0,01	6,16
<i>spr0356</i>	<i>mtlA</i>	Mannitol PTS EII	0,01	0,16
<i>spr0405</i>		Hypothetical protein	0,00	3,26
<i>spr0524</i>	<i>vex1</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,00	7,33
<i>spr0526</i>	<i>vex3</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - Pep export	0,02	3,00
<i>spr0561</i>	<i>prtA</i>	Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA	0,00	3,78
<i>spr0617</i>		Hypothetical protein	0,00	3,99
<i>spr0618</i>		Hypothetical protein	0,00	3,13
<i>spr0914</i>	<i>hemH</i>	Ferrochelatase	0,00	4,96
<i>spr1325</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,32
<i>spr1326</i>		Hypothetical protein	0,00	3,81
<i>spr1546</i>	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,03	0,28
<i>spr1547</i>		Hypothetical protein	0,00	0,19
<i>spr1548</i>		Hypothetical protein	0,00	0,15
<i>spr1549</i>		Hypothetical protein	0,00	0,19

7. Anhang

Gen-Nr.	Gen	Funktion/Domäne	P- Wert	Transkriptverhältnis P106/R6
<i>spr1558</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	4,16
<i>spr1559</i>	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	0,00	5,19
<i>spr1560</i>		Hypothetical protein	0,00	4,81
<i>spr1684</i>	<i>fatD</i>	ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport	0,02	0,28
<i>spr1724</i>	<i>ssbB</i>	Single-stranded DNA-binding protein	0,00	0,33
<i>spr1858</i>		Hypothetical protein	0,00	0,28
<i>spr1859</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	0,24
<i>spr1862</i>	<i>cglC</i>	Competence protein	0,00	0,28
<i>spr1863</i>	<i>cglB</i>	Competence protein	0,00	0,28
<i>spr1864</i>	<i>cglA</i>	Competence protein	0,00	0,28
<i>spr1945</i>	<i>pcpA</i>	Choline-binding protein	0,00	5,33
<i>spr1966</i>		Conserved hypothetical protein	0,00	3,46
<i>spr1967</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	3,11
<i>spr1969</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	5,62
<i>spr1970</i>		Phosphotransferase system sugar-specific EII component	0,00	6,27
<i>spr1971</i>	<i>fucU</i>	Fucose pathway protein, function unknown	0,00	7,04
<i>spr1972</i>	<i>fucA</i>	L-fucose phosphate aldolase	0,00	5,38

Publikationen

Meiers M., Volz C., Eisel J., Maurer P., Henrich B., Hakenbeck R. (2014). Altered lipid composition in *Streptococcus pneumoniae* *cpoA* mutants. *BMC Microbiol.* **14**:12

Marx P., Meiers M. und Brückner R. (2015): Activity of the response regulator CiaR in mutants of *Streptococcus pneumoniae* R6 altered in acetyl phosphate production. *Front Microbiol.* **5**:772.

Danksagung

Im Laufe der vergangenen Jahre gab es einige Menschen, die mich sowohl fachlich, als auch persönlich unterstützt haben und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Reinhold Brückner für die ausgezeichnete Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und die ständige Hilfsbereitschaft. Die wertvollen Diskussionen und die vielen Ratschläge und Ideen haben viel zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. John Cullum für die Übernahme der Zweitkorrektur, sowie an Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich herzlich für die tolle Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Möglichkeit meine Arbeit in der Abteilung Mikrobiologie anzufertigen, sowie das stetige Interesse und die vielfältigen Anregungen.

Frau Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel danke ich für die freundliche Übernahme der „alten Mibis“.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Patrick Maurer für die tolle Betreuung und die vielen hilfreichen Ratschläge zu Beginn meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Henrich danke ich für seine Hilfe bei den Translationsfusionen zur Bestimmung des CpoA-Starts.

Ein großer Dank geht an Herrn Martin Rieger, für die Auswertung der Genomsequenzen, seine Unterstützung bei der Auswertung der Transkriptomanalysen und dem ein oder anderen Computerproblem.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre im Laboralltag beigetragen haben. Ein besonderer Dank geht hierbei an Anke, Anne, Patrick, Inga, Kathi, Dalia, Yasmin, Martin, und Daniela. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Tipps, die angenehmen Gespräche und lustigen Stunden im Labor.

Ein großer Dank an die Praktikanten, deren Konstrukte in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Danksagung

Anne, Anke und Yasmin danke ich herzlich für die Unterstützung, die vielen lieben Worte und die schöne Zeit im und außerhalb des Labors.

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Familie, die mich immer unterschützt und mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Waldemar, Dir danke ich für die Unterstützung, die vielen motivierenden Worte und die wundervolle Zeit, die ich mit Dir verbringen darf.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marina Meiers

Ausbildung

- seit 08/11 TU Kaiserslautern
Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion in der Abteilung
Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie
- 10/2005-07/2011 TU Kaiserslautern
Studium der Biologie
(Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Zoologie, Landschafts- und
Grünordnungsplanung)

Thema der Diplomarbeit: Piperacillin-resistente Labormutanten von
Streptococcus pneumoniae: Beteiligung von Nicht-PBP-Genen
- 08/04-07/05 Gymnasium am Stefansberg Merzig
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 08/96-07/04 Peter-Dewes Gesamtschule Losheim am See
- 08/92-07/96 Nicolaus-Voltz Grundschule Losheim am See

Berufliche Tätigkeit

seit 08/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, TU Kaiserslautern, Abteilung Mikrobiologie
