



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Identifikation essentieller Gene in *S. pneumoniae*,
S. aureus und *H. influenzae*“

Verfasserin

Katja Balazs

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, Oktober 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 490

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Molekulare Biologie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte

Wer sich Steine zurechtlegen kann,
über die er stolpert,
hat Erfolg in den Naturwissenschaften.

Erwin Chargaff (1905-2002)

Inhalt

I. Allgemeiner Teil.....	7
1. Einleitung.....	7
1.1. Geschichte der Antibiotika	7
1.2. Klassen von Antibiotika und Entwicklung von Resistenzmechanismen	7
1.3. Methoden zur Bestimmung der Essentialität eines Genes	11
1.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.4.1. Competence Stimulating Peptide CSP	20
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.6. <i>Haemophilus influenzae</i>	22
2. Zielsetzung	24
3. Material und Methoden	26
3.1. Ausgewählte Gene	26
3.2. Oligonukleotide	26
3.2.1. Primerdesign für <i>S. pneumoniae</i> Deletions - Konstrukte	26
3.2.2 Primerdesign für <i>S. pneumoniae</i> Disruptions - Konstrukte	27
3.2.3 Primerdesign für <i>S. aureus</i> Duplikations und Disruptions - Konstrukte.....	28
3.2.4. Primerdesign für <i>S. aureus</i> Kontroll-PCR's.....	28
3.2.5. Primerdesign für <i>H. influenzae</i> Deletions - Konstrukte	28
3.2.6. allgemeine Primer.....	29
3.3. verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	30
3.4. Chemikalien und Kits und Bezugsquellen.....	31
3.5. Geräte.....	32
3.6. Lösungen.....	33
3.7. Medien.....	37
3.8. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme.....	40
3.9. Methoden.....	40
3.9.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α	40
3.9.1.1. Transformation in chemisch kompetente <i>E.coli</i> DH5 α	41
3.9.2. Herstellung elektrokompetenter <i>S. aureus</i> RN4220.....	41
3.9.2.2. Transformation in elektrokompetente <i>S. aureus</i> RN4220	42
3.9.3. PCR-Ansätze	42
3.9.3.1.PCRs für Klonierungen	42

3.9.3.2. PCRs für Kolonie-PCRs.....	43
3.9.3.3. PCRs für 1kb Fragmente	43
3.9.3.4. PCRs für 3kbp Fragmente (Deletionskassetten).....	44
3.9.4. DNA-Isolierung	45
3.9.4.1. Isolierung der genomischen DNA aus <i>S.pneumoniae</i> TIGR4	45
3.8.4.2. Isolierung der Miniprep DNA aus <i>E. coli</i> DH5 α	45
3.9.4.3. Isolierung der DNA aus Agarosegelen.....	46
3.9.4.6. PCR Aufreinigung mittels QIAGEN PCR Purification Kit	46
3.9.5. Klonierung der Disruptionskonstrukte	46
3.9.5.1. Restriktionsverdau von Vektor und Inserts	46
3.9.5.2. Ligation, Transformation und Isolation der Miniprep DNAs.....	47
3.9.6. Herstellung von <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 Arbeitsstocks	48
3.9.6.1. Transformation in <i>S. pneumoniae</i> TIGR4	48
3.9.7. Herstellung von <i>H. influenzae</i> Rd KW20 Arbeitsstocks	48
3.9.7.1. Transformation in <i>H. influenzae</i> Rd KW20.....	48
3.9.8. Knock-outs in <i>S. aureus</i> RN4220.....	49
4. Resultate	50
4.1. Isolierung der genomischen DNA	50
4.2.Etablierung einer knock-out Methode in <i>S.pneumoniae</i>	50
4.2.1. Herstellung der Suizidvektoren mit entsprechenden Fragmenten	51
4.2.2. Herstellung der linearen 3kbp Konstrukte für die ARM	53
4.2.3. Transformation der Konstrukte und Generierung der Knock-outs	54
4.2.4. Anwendung der ARM auf weitere <i>S. pneumoniae</i> Gene	56
4.3. Etablierung einer knock-out Methode in <i>S. aureus</i>	56
4.3.1. Gendisruption	56
4.3.2. verwendete Gene zur Etablierung in <i>S. aureus</i>	59
4.3.3. Herstellung der Duplikations- und Disruptionskonstrukte	60
4.3.4. Optimierung der Elektroporation in <i>S. aureus</i> RN4220.....	62
4.3.5. Optimierung der Disruption/Duplikation für Essentialitätsstudien in <i>S. aureus</i> 64	
4.3.5.1. Essentialitätsstudien mit Flüssigkulturen	64
4.3.5.2. Essentialitätsstudien mit Agarplatten	68
4.3.6. Überprüfung auf Integration am richtigen Locus in <i>S. aureus</i>	71
4.3.7. Anwendung der IDM auf weitere <i>S. aureus</i> Gene	72
4.4. Etablierung einer knock-out Methode in <i>H. influenzae</i>	73

4.4.1. Herstellung der linearen 3kbp Fragmente für ARM.....	73
4.4.2. Transformation der Konstrukte und Generierung der Knock-outs	76
4.4.3. Anwendung der ARM auf weitere <i>H. influenzae</i> Gene.....	78
5. Diskussion	79
6. Zusammenfassung	84
7. Anhang	86
7.1. Gensequenzen	86
7.1.1 ftsZ (SP1666) in <i>S. pneumoniae</i> TIGR4	86
7.1.2. ftsZ (SAc1199) in <i>S. aureus</i> COL	88
7.1.3. ftsZ (HI1143) in <i>H. influenzae</i> Rd KW20.....	89
7.1.4. Kanamycin Kasette.....	91
8. Literatur	92
II. Curriculum vitae.....	96
III. Danksagungen	97

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Bp	Basenpaare
BHI	Brain Heart Infusion
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm	Erythromycin
erm ^R	Erythromycinresistent
et al.	,et alteri' (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
k	Kilo
Kan	Kanamycin
KAc	Kaliumacetat
kbp	Kilobasenpaare (1kb=1000 Bp)
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mol oder Mega (10 ⁶)
m	milli-(10 ⁻³)
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MCS	Multiple cloning site
min	Minute
MnCl ₂	Mangan(II)chlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, 4-
MRSA	Morpholinepropanesulfonic acid
n	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
NAD	nano-(10 ⁻⁹)
NADP	β-Nicotinamide adenine dinucleotide
NaOH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat
μ	Natriumhydroxid
	mikro-(10 ⁻⁶)

OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260nm
OD ₂₈₀	optische Dichte bei 280nm
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
Ori	Replikationsstartpunkt
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur,
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
tet ^S	Tetrazyklinsensitiv
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unit
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>S. aureus</i>
z.B.	zum Beispiel

I. Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Die Antibiotikaresistenz nimmt weltweit immer schneller zu, sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Keimen. Dies trifft vor allem auf Keime zu, die für nosokomiale (in Spitälern erworbene) Infektionen verantwortlich sind. In vielen Situationen bleibt nur noch eine beschränkte Anzahl wirksamer Antibiotika übrig. Diese resistenten Keime bewirken eine erhöhte Lethalität und die Behandlung ist oft nur mehr mit Antibiotika möglich, die eine geringe Wirksamkeit zeigen und beachtliche zusätzliche Kosten verursachen (1).

1.1. Geschichte der Antibiotika

1910 wurde von Paul Ehrlich die erste antibiotisch wirksame Substanz entwickelt. Bei *Salvarsan*[®], einer giftigen Arsenverbindung, handelte es sich damals eigentlich nicht um ein Antibiotikum, da es sich bei Antibiotika laut Definition um Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen handelte. *Salvarsan*[®] wurde erfolgreich gegen Syphilis und einige Tropenkrankheiten eingesetzt (2). 1932 folgte Prontosil. Gerhard Domagk entdeckte diesen ersten Vertreter der zur Klasse der Sulfonamide gehörigen Antibiotika (2). Das erste „richtige“ Antibiotikum wurde von Alexander Fleming im Jahre 1928 entwickelt. Er züchtete in Petrischalen Bakterien, die immer wieder mit Schimmelpilzen kontaminiert waren. Er beobachtete, wie rund um einige der Pilze kein Bakterienwachstum auftrat. Aus dem Schimmelpilz *Penicillium* konnte er letztendlich das Antibiotikum Penicillin isolieren, das aber erst seit 1941 am Markt ist. 1945 bekam Alexander Fleming für die Entdeckung des Penicillins den Nobel Preis (2).

1.2. Klassen von Antibiotika und Entwicklung von Resistenzmechanismen

In den darauf folgenden Jahren wurden eine Reihe weiterer neuer Substanzklassen an Antibiotika entwickelt. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, handelt es sich bei den Substanzen hauptsächlich um natürlich vorkommende Stoffe. In den Jahren 1940 bis 1960 wurden fast nur Antibiotika natürlichen Ursprunges isoliert (3). Viele davon wurden durch systematische Suche antibakteriell wirkender Substanzen von verschiedenen Mikroorganismen entdeckt. Mit dieser Strategie wurden eine Vielzahl bekannter Antibiotika wie zum Beispiel die β -Lactame, Tetracycline, Aminoglycoside und auch Glycopeptide gefunden. Die Antibiotikaproduzenten brauchen diese

Substanzen selbst, damit sie einen Vorteil gegenüber anderer Mikroorganismen haben um zum Beispiel geringe Nährstoffquellen nicht mit anderen Keimen teilen zu müssen. Mit Hilfe der Medizinalchemie wurden die neuen Antibiotikaklassen der Sulfonamide, Quinolone und Oxazolidinone entwickelt.

Jahr	Antibiotikum	Klasse	natürlich	synthetisch
1929	Penicillin	β-Lactam	√	
1940	Penicillin			
1932	Sufapyridin	Sulfonamid		√
1944	Streptomycin	Aminoglycosid	√	
1945	Cephalosporin	β-Lactam	√	
1947	Chloramphenicol	Phenylpropanoid	√	
1948	Chlortetracyclin	Tetracyclin	√	
1950	Erythromycin	Makrolid	√	
1955	Vancomycin	Glycopeptid	√	
1955	Virginiamycin	Streptogramin	√	
1955	AMphothericin	Polyen	√	
1955	Lincomycin	Lincosamid	√	
1959	Rifampicin	Ansamycin	√	
1962	Nalidixinsäure	Quinolon		√
1969	Fosofomycin	Phosphonat	√	
1980	Ciprofloxacin	Fluoroquinolon		√
2000	Linezolid	Oxazolidinon		√
2003	Daptomycin	Lipopeptid	√	

Tab. 1: Zeitpunkte der Entwicklung neuer Antibiotikaklassen

Aber gerade durch den Einsatz von Antibiotika wurde vermehrt auf resistente Keime selektioniert und es konnte bei allen klinisch eingesetzten antibakteriellen Substanzen rasch dazupassende resistenten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Durch die Vielzahl der Bakterien (bis zu 10^{10}) während einer Infektion und der hohen Mutationsrate der Bakterien ist garantiert, dass die nicht resistenten Keime absterben und die wenigen, durch Mutation zum Beispiel, resistenten Keime, sich aufgrund des Selektionsvorteiles vermehren können. Dies geschieht besonders häufig, wenn Antibiotika in zu geringen Dosen und/oder zu kurz eingesetzt werden.

In Abb. 1 ist der Beginn des klinischen Einsatzes von verschiedenen Antibiotika der letzten 70 Jahren abgebildet.



Abb. 1: Klinischer Einsatz von Antibiotika während der letzten 70 Jahre
Angegeben sind auch jeweils das Wirkziel und ein Beispiel für die Antibiotikaklasse
modifiziert nach Walsh (2003)

Besonders auffällig ist die 40-jährige Pause zwischen der Entwicklung der beiden synthetischen Substanzen der Quinolone (1962) und der Oxazolidinone (2000). Viele „neue“ Antibiotika entstanden durch leichte Modifikationen in ihrer Struktur, welche die Wirksamkeit und/oder die Pharmakokinetik verbesserten. Die Vielzahl verschiedener Substanzklassen und darin vorhandenen Verbindungen und Variationen reichte aus, die bis dahin kaum resistenten Bakterien zu behandeln. Ein weiterer Grund für das Fehlen neuer Entwicklungen ist, dass große Pharmafirmen für die Erforschung neuer Substanzen für die Behandlung gegen Mikroorganismen wenig Kapital aufbringen. Viele Firmen stellen ihre „anti-bacterial“ Programme sogar vollständig ein.

Penicilline waren 1940 das Mittel der Wahl zur Behandlung von Staphylokokkeninfektionen. Innerhalb nur eines Jahres gelang es diesen Keimen Resistenzen gegen diese Medikamente zu entwickeln. Ein Jahrzehnt später verbreitete sich die β -Lactamresistenz so rasch, dass die Forscher gezwungen waren, eine neue Substanz zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen zu suchen. Die Entwicklung und der Einsatz von Methicillin konnte aber auch nicht auf Dauer den gewünschten Erfolg bringen. Erkrankungen mit Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) nahmen so rasch zu, dass 1986 Vancomycin als Therapiemittel gegen

MRSA eingesetzt wurde. Seit damals entwickeln MRSA aber eine Resistenz gegen Vancomycin (VRSA) und die Entwicklung neuer Medikamente musste vorangetrieben werden (4). Antibiotikaresistenzen werden aber auch durch horizontalen Gentransfer zwischen Bakterienspezies übertragen. Einige Mikroorganismen enthalten extrachromosomale Plasmide, die für verschiedene Proteine codieren, wie zum Beispiel Virulenzfaktoren (z.B. Toxine) aber auch Antibiotikaresistenzen (z.B. Übertragung der Vancomycinresistenz von *E. faecalis* auf *S. aureus* (5)).

Bakterien können Antibiotika auf verschiedenste Weisen bekämpfen. Diese kann man zu drei Hauptmechanismen zusammenfassen (6). Einerseits versuchen bakterielle Enzyme die Antibiotika zu zerstören. β -Lactamasen zum Beispiel, hydrolysieren die Lactamringe der Penicilline und machen diese damit unwirksam. Eine andere Strategie ist, das Angriffsziel der Substanz so zu verändern, dass das Bakterium keine Beeinträchtigung zum Überleben hat, aber die Substanz keine Wirkung mehr zeigt (z.B. Vancomycinresistenz bei Enterococcen, (7) oder Quinolonresistenz durch Mutation in *gyrA/grlB* (8)). Die dritte Möglichkeit der Resistenz ist, das Antibiotikum aktiv mittels Transmembran Efflux-Pumpen aus der Zelle herauszupumpen. Mit dieser Methode kann die toxische Konzentration der Substanz innerhalb der Zelle gering gehalten werden. Dieser Mechanismus ist besonders bei Pseudomonaden weit verbreitet (9).

Antibakterielle Substanzen können über verschieden Targets wirken:

- (1) bakterielle Zellwandbiosynthese (z.B. β -Lactame und Vancomycin)
- (2) bakterielle Proteinsynthese (z.B. Makrolide und Aminoglycoside)
- (3) bakterielle DNA-Synthese und - Repair (z.B. Fluorochinolone)

β -Lactamantibiotika, wie zum Beispiel das Penicillin und Cephalosporin, fungieren als Pseudosubstrate für die bakteriellen Enzyme, die für den Aufbau und die Vernetzung der Peptidoglycanschichten verantwortlich sind. Sie acetylieren das aktive Zentrum der Transpeptodasedomäne der Enzyme (daher der Name Penicillin-bindende Proteine, PBPs). Die Vernetzung der Peptidoglycanschichten kann dadurch nicht korrekt erfolgen und die Zellwände werden mechanisch instabil und anfällig für Lyse aufgrund des osmotischen Druckes. Das Glycopeptidantibiotikum Vancomycin bindet

dagegen an das Peptidsubstrat und verhindert dadurch die Reaktion mit der Transpeptidase- und der Transglycosylasedomäne des Enzyms. Vancomycin geht mit jedem unverzweigten D-Ala-D-Ala-Dipeptid der Peptidoglycanschicht über fünf Wasserstoffbrückenbindungen eine kovalente Bindung ein. Das erklärt die hohe Affinität dieser Antibiotikagruppe für sein Target (sowohl in partiell verzweigten Zellwänden wie auch in anderen Intermediaten während der Zellwandsynthese) (6).

Da sich die RNA und Proteinmaschinerie in Prokaryonten vollkommen von jenen in Eukaryonten unterscheidet, eignen sich die dabei beteiligten und benötigten Komponenten als ideale Wirkstoffziele. Die wichtigen Antibiotikagruppen wie die Makrolide, die Erythromycinklasse, die Aminoglycoside und seit 2000 die Oxazolidone binden an die Peptidyltransferasestelle der 23S rRNA wodurch die Proteinsynthese inhibiert wird. Die Fluoroquinolone, wie zum Beispiel das Ciprofloxacin, töten Bakterien durch die Bindung an die bakterielle DNA-gyrase und die dazu verwandte Topoisomerase IV, eine weitere Typ II Topoisomerase. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und ist somit essentiell für das Bakterium (6).

1.3. Methoden zur Bestimmung der Essentialität eines Genes

Es gibt zahlreiche Wege, um Gene zu definieren, die für das Überleben eines Bakteriums notwendig sind. Durch das Vorhandensein von mehr als 200 durchsequenzierten bakteriellen Genomen steht eine Vielzahl an Sequenzdaten zur Verfügung. Diese ergänzen und unterstützen experimentelle Daten bezüglich Essentialität eines Genes. Durch *comperative genomics* können auch ausschließlich bioinformatische Analysen durchgeführt werden. Es besteht die Annahme, dass in Organismen mit den kleinsten Genomen fast alle Gene essentiell für das Überleben sein müssen. (10,11). *M. genitalium* besitzt das bislang kleinste sequenzierte Genom mit für 468 Proteine kodierenden Genen (11). Durch Vergleich mit den für ungefähr 1700 Proteine kodierenden Genen von *H. influenzae* konnten 256 Gene bestimmt werden, die für das Überleben eines Bakteriums notwendig sein könnten. (10). Bei 240 Genen handelt es sich um orthologe Sequenzen in beiden Organismen. Die fehlenden Proteine in essentiellen Pathways konnten durch das Vorhandensein nicht-orthologer Gene, die dieselbe Funktion in unterschiedlichen Organismen ausüben, erklärt werden. Die meisten dieser bioinformatisch gefundenen Proteine sind hochkonserviert und zeigen eine starke Ähnlichkeit zu eukaryontischen und

archaischen Proteinen. Durch die Bioinformatik können auch andererseits zu bekannt essentiellen Genen Orthologe in anderen Organismen gefunden werden. Die Sequenzähnlichkeit spielt dabei keine so große Rolle. Wichtig hierbei ist eine identische essentielle biologische Funktion.

Sehr häufig werden klassische genetische Methoden zur Bestimmung der Essentialität verschiedenster Genprodukte angewandt. In *H. influenzae* und *S. pneumoniae* wurden transposonbasierte Methoden angewandt (12). Hierbei wurde das Verfahren *Genomic analysis and mapping by in vitro transposition* (GAMBIT) entwickelt. Im ersten Schritt wurden Minitransposons, die Inverted Repeats vom *Himar1* Transposon und etwa 100bp *Himar1*-Sequenz flankierend zu einer Antibiotikaresistenzkassette enthalten, hergestellt.

In vitro wurden entweder chromosomale DNA oder PCR-Produkte anschließend mit diesen *Himar1* Minitransposons mutagenisiert. Die so erhaltenen Transpositionsprodukte wurden in *H. influenzae* beziehungsweise *S. pneumoniae* transformiert, wo diese durch homologe Rekombination ins Chromosom integrierten. Nach Selektionierung auf rekombinante Klone wurden diese gepoolt. Den einzelnen Pools fehlten jene Rekombinanten, bei denen die Insertion in essentiellen Genen stattgefunden hatte. Mit chromosomal-spezifischen und transposon-spezifischen synthetisch hergestellten Oligonukleotiden wurde mittels PCR die Position der Transposition festgestellt. Wie in Abb. 2 ersichtlich ist, fehlen jene PCR-Produkte, bei denen keine Mutanten auswachsen konnten.

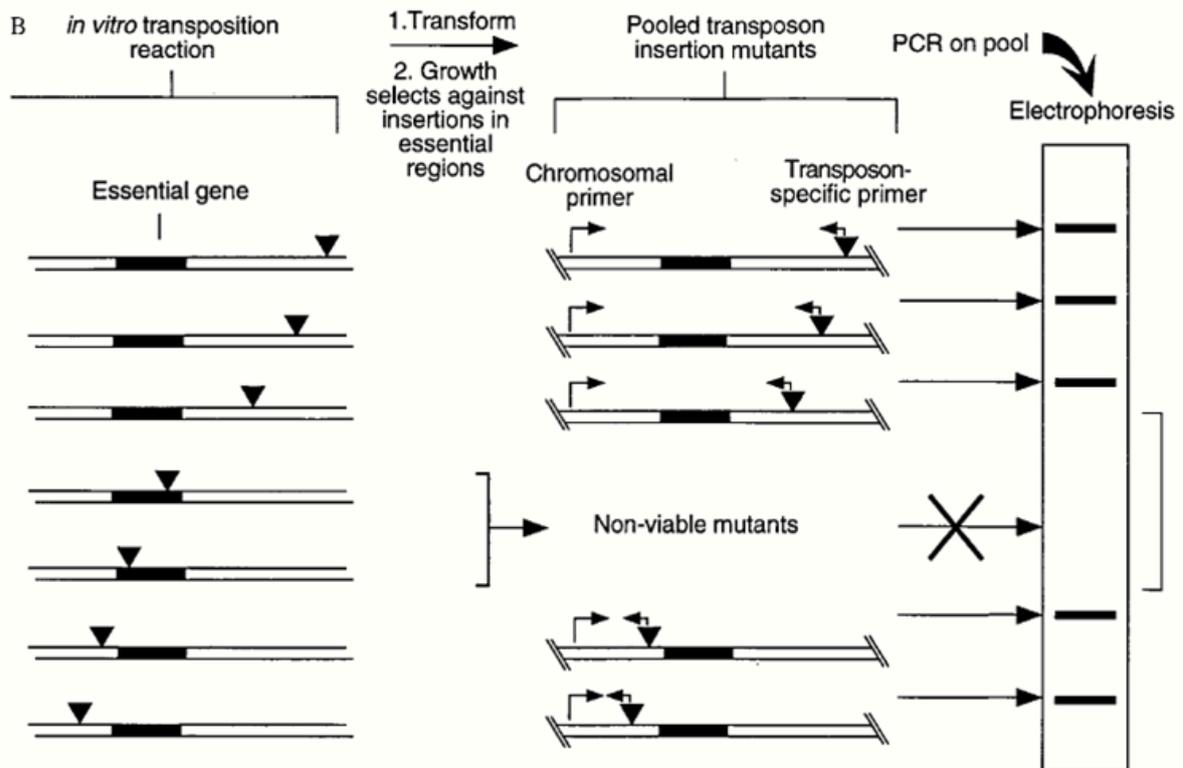


Abb. 2: „Genetic Footprinting“
Übernommen aus Akerley *et al.* (1998)

Nach dieser Methode wurde in einem High-throughput Verfahren das gesamte Genom von *E. coli* auf Gene gescreent, die für das Überleben in Vollmedium notwendig sind (13). Von den 4293 untersuchten Genen wurden 619 Gene (14.4%) als essentiell eingestuft.

Eine weitere Variation der Transoson-Mutagenese ist das TnAraOut System (14). Das verwendete Transposon kodiert zusätzlich für den Arabinose-inuzierbaren Promotor P_{BAD} . Ein Wachstum von Mutanten, bei denen das Transposon im nativen Promotor vor einem essentiellen Gen integriert war, war nur mehr unter Arabinose möglich. So konnten in *V. cholerae* 16 essentielle Gene identifiziert werden.

Die Bestimmung der Essentialität verschiedener *H. influenzae* Gene wurde in der Literatur mit unterschiedlichen Methoden beschrieben. Akerley *et al* (15) führte eine genom-weite Transposonmutagenese durch. Dabei wurden 10kbp lange Bereiche, die jeweils mit ungefähr 5kbp miteinander überlappen, mittels PCR vom Chromosom herausamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden *in vitro* mit dem Tn*magellan4* Transposon mutagenisiert. Dieses Transposon enthält neben der

Kanamycinresistenzkassette und den flankierenden transposon-inverted Repeats auch die uptake sequence (US). *H. influenzae* gehört zu den natürlich kompetenten Bakterien. Die Effizienz der DNA-Aufnahme wird durch das Vorhandensein einer uptake-sequence in der aufzunehmenden DNA erhöht (16). Diese US ist im Genom von *H. influenzae* ungefähr 1500mal identifiziert worden. Dort liegen sie zu etwa 70% als inverted repeats vor und befinden sich meistens am Ende eines Genes. Die inverted repeats können eine stem-loop Struktur in der mRNA ausbilden und fungieren wahrscheinlich als Transkriptonsterminatoren.

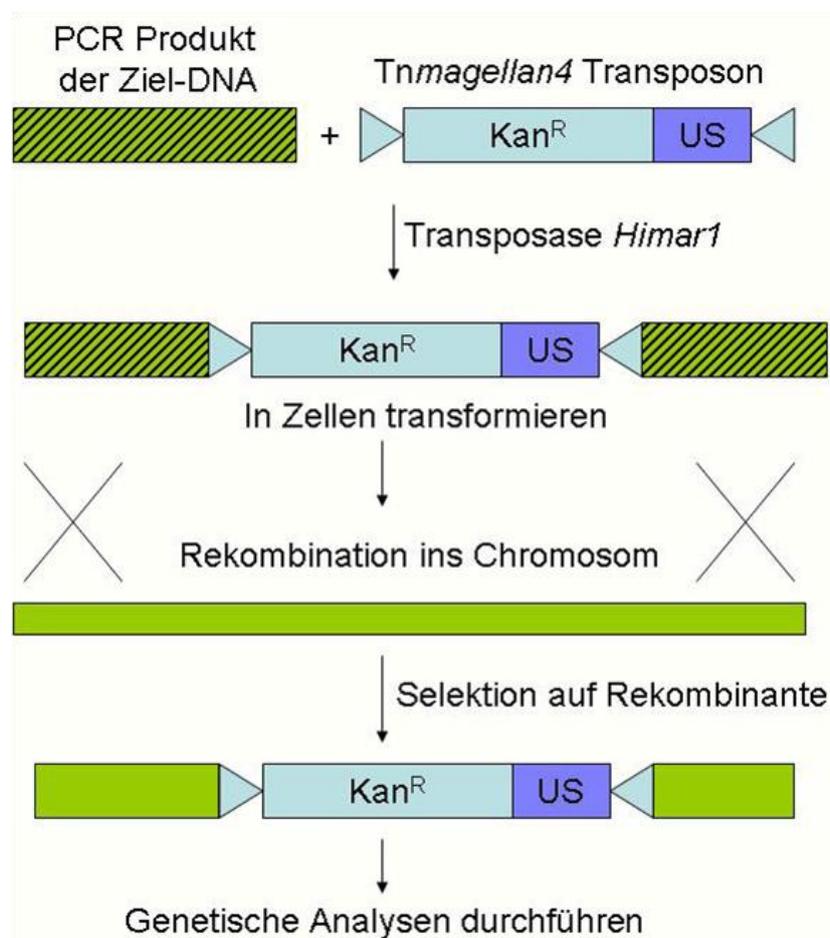


Abb. 3: Strategie der genom-weiten Transposonmutagenese nach Akerley *et al.*(2002)

Durch diese Transposonmutagenese konnten 478 essentielle Gene, wobei 259 Gene mit unbekannter Funktion sind, bestimmt werden.

Auch bei Reich *et al.* (17) wurde mit einem in vitro Transposonsystem gearbeitet. Bei dieser Methode wurde nach erfolgter Mutation auf zwei verschiedene Arten nach essentiellen Genen gescreent. Einerseits wurde die Insertionsbibliothek nach open reading frames (ORF) untersucht, die keine Insertionen enthielten. In einer

wachsenden Population sollten keine Insertionen in essentiellen Genen vorhanden sein, da sonst das Wachstum des Bakteriums verhindert werden würde. Andererseits wurden individuelle Insertionen in wachsenden Kulturen beobachtet. Es wurde der Verlust der Insertionen in essentiellen Genen mit der Zeit festgestellt. Mit dieser Methode wurden keine ORFs untersucht, die kleiner als 300bp waren.

Eine Alternative zu den Transposon-basierten Verfahren stellt der Gen-knockout dar. Dabei werden Resistenzkassetten oder Vektoren in das zu untersuchende Gen integriert oder das gesamte Gen gegen eine Antibiotikaresistenz ausgetauscht.

Bei Zalacain *et al* (18) wurden die Gene in *S. pneumoniae* und *H. influenzae* mittels Allelic Replacement Mutageneses (ARM) deletiert und so auf deren Essentialität untersucht. Wie in Abb. 4 zu sehen ist, werden im ersten Schritt 1000bp große 5'- und die 3'-Flanken des zu untersuchenden Genes mittels PCR amplifiziert. Anschließend werden die beiden Flanken und eine Antibiotika-Kassette als Selektionsmarker in einer weiteren PCR zu einem etwa 3kbp großen Fragment fusioniert.

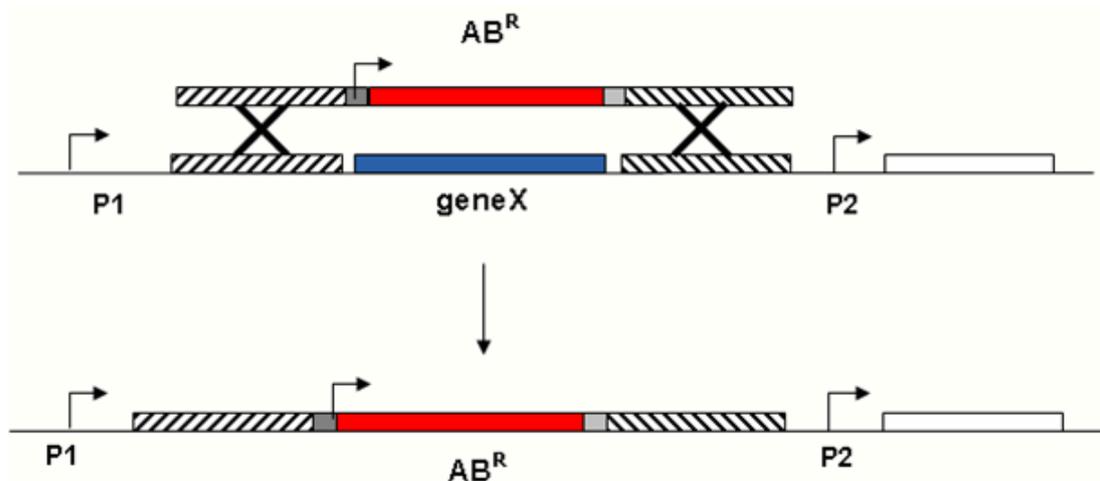


Abb. 4: Gendeletion mittels linearen DNA-Konstrukten

Diese knock-out Kassetten besitzen jeweils 1000bp homologe Sequenzen zu den 5' und 3' Flanken des Zielgenes sowie eine geeignete Antibiotikaresistenzkassette als Selektionsmarker.

Durch diese Allelic Replacement Methode konnten bei 20 zu *S. pneumoniae* orthologen Genen in *H. influenzae* die Essentialität gezeigt werden. In *B. subtilis*

wurden 79 zufällig ausgewählte Gene mit dieser Methode untersucht und 6 davon waren bezüglich der Notwendigkeit für das Überleben des Keimes (19).

Eine weitere Methode zur Feststellung der Essentialität eines Gens ist die Gendisruption (Insertion Duplikation Mutageneses, IDM). Bei diesem Verfahren wird ein interner Teil (500bp bis 700bp) des auszuschaltenden Gens mit genspezifischen Primern, welche Restriktionsschnittstellen versehen sind, mittels PCR amplifiziert und nach erfolgtem Restriktionsverdau in einen geeigneten Suizidvektor (siehe Abb. 5) liegt und zur Vervielfältigung in *E. coli* transformiert. Die Suizidvektoren besitzen einen Ori für die Replikation in Gram-negativen Bakterien. Dadurch ist ein einfaches Klonieren und rasche DNA-Isolierung im *E. coli* System möglich. Für die Selektion hat der Vektor eine Erythromycinresistenz (20,21).

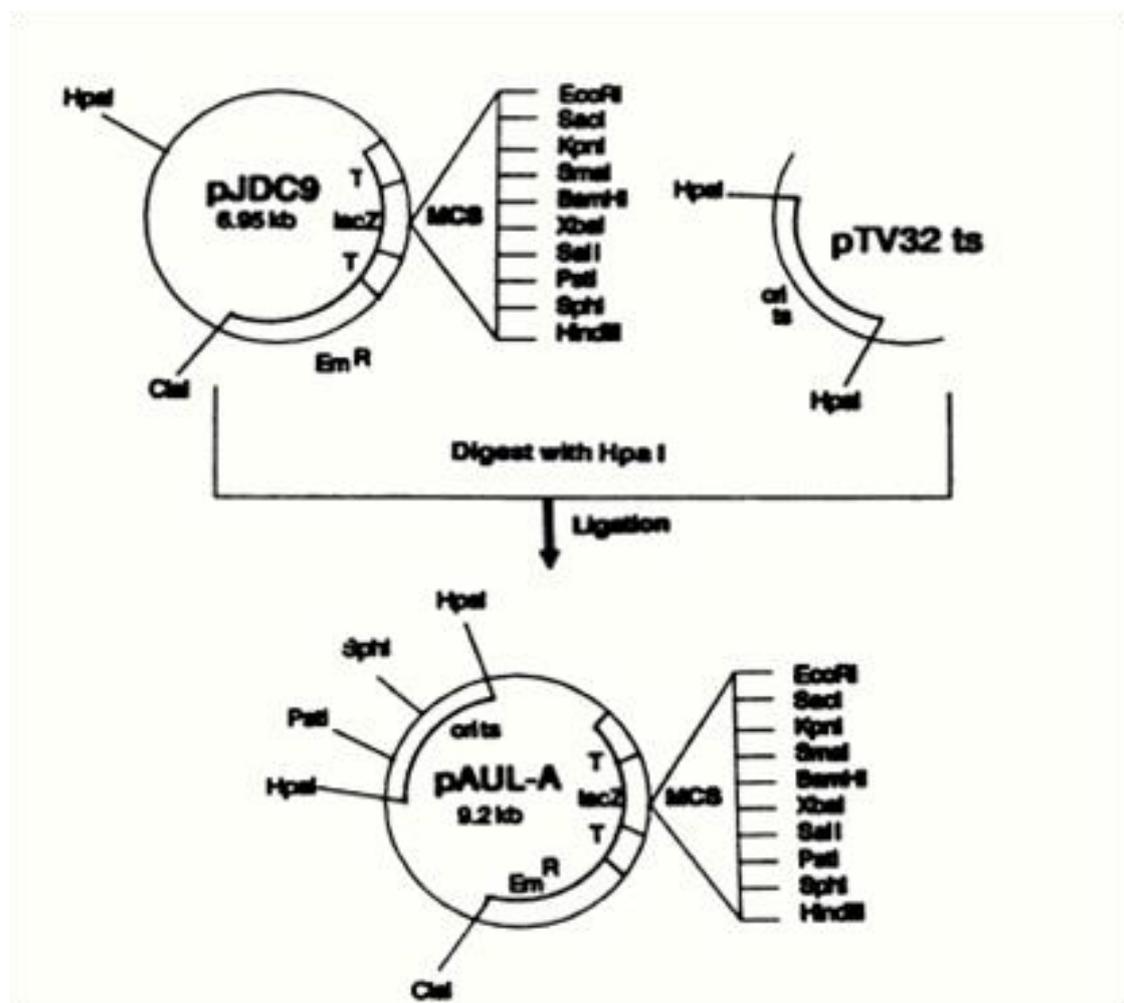


Abb. 5: Suizidvektoren für Insertion Duplikation Mutageneses
Bei pJDC9 handelt es sich um einen Suizidvektor für *S. pneumoniae*.
pAUL-A enthält noch zusätzlich einen temperatursensitiven ori.
Übernommen aus Chakraborty *et al.* (1992)

Nach erfolgter Plasmidpräparation aus *E. coli* wird das Bakterium mit diesem Suizidvektor transformiert. Da dieser Vektor keinen Ori für Gram-positive Bakterien besitzt, muss der Vektor, um im Keim verweilen zu können, sich ins Chromosom integrieren (Abb. 6). Dadurch wird gewährleistet, dass der Vektor durch einfache homologe Rekombination mit dem Zielgen dieses durch Disruption inaktiviert. Sollte das betrachtete Gen nicht essentiell sein, würde auf entsprechenden Selektionsmedium Kolonien auswachsen.

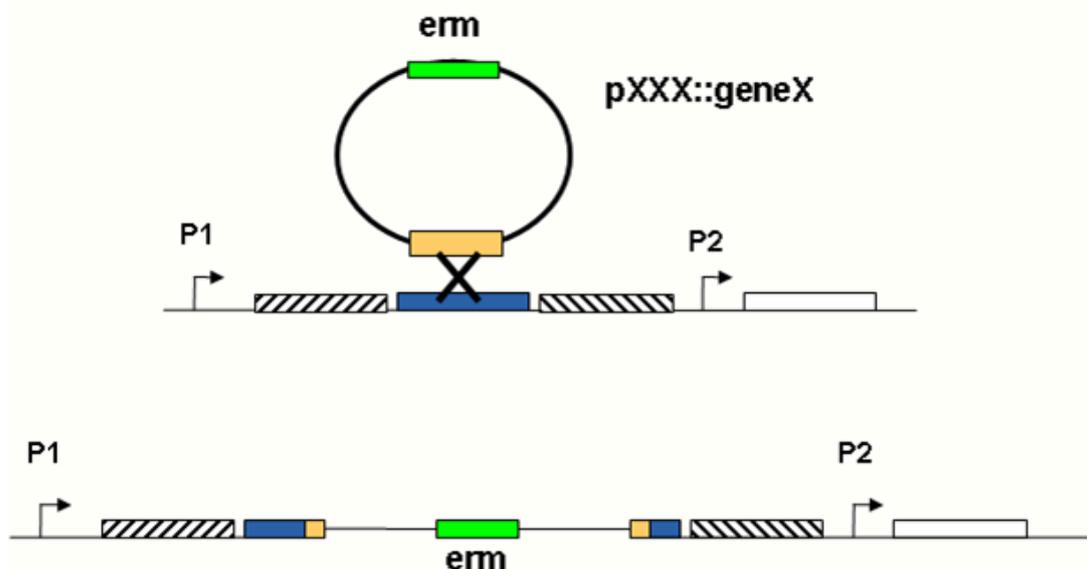


Abb. 6: Gendisruption mit Suizidvektoren

Durch homologe Rekombination mit dem Zielgen wird das Gen disruptiert. Sollte das Gen essentiell sein, wachsen keine Kolonien aus.

In *B. subtilis* wurden 2957 Gene einzeln mit dieser Methode gezielt untersucht und 150 davon waren essentiell für die Überlebensfähigkeit des Keims (22). In *S. pneumoniae* waren von 357 untersuchten Genen 113 essentiell (23).

Forsyth *et al* (24) führte eine genomweite Strategie durch um essentielle Gene in *S. aureus* zu finden. Das Prinzip, das hinter dieser Methode steht, ist, dass antisense RNA die Genexpression der dazugehörigen mRNA inhibiert. Bei dieser Methode wurden chromosomale DNA-Fragmente in einem Xylose-induzierbaren Vektor kloniert und anschließend in *S. aureus* RN4220 transformiert. Xylose-sensitive Klone wurden auf das Vorhandensein von antisense-orientierter DNA, bezogen auf den Xylosepromotor pTX5, überprüft und selektioniert. Nach der Induktion der antisense

RNA wurde das Wachstumsverhalten beobachtet. Bei essentiellen Genen konnte durch diese Methode das Wachstum stark inhibiert werden. Es wurden 658 *S. aureus* Gene gefunden, die sensitiv auf Antisense Expression reagierten.

Ji *et al* (25) entwickelte eine ähnliche Methode für *S. aureus* - die RNA antisense Technologie (Abb. 7). Die Expression der antisense RNA resultierte in einem letalen oder wachstums-inhibierenden Effekt bei 150 *S. aureus* Genen. Ein Tetrazyklin (tet) Transkriptions Regulationssystem wird hierbei zur Regulation der Gen und Antisense Expression. Hierbei werden 200-800bp lange Fragmente der chromosomalen DNA in einen anhydrotetrazyklin (ATc) induzierbaren Vektor pYJ335 downstream der tet Regulationsregion kloniert. Für die Herstellung der DNA Library wird die DNA in *E. coli* DH10B transformiert. Die Transformanten werden gepoolt, amplifiziert und anschliessend die DNA isoliert. Diese wird danach im ersten Schritt in *S. aureus* RN4220 transformiert und anschliessend nach einer Passage in den klinischen Stamm *S. aureus* WCUH29 transformiert. Diese Transformanten werden dann auf Platten mit und ohne ATc dupliziert. Wachstumsdefekte und lethale Kolonien werden nach overnight Inkubation selektiert.

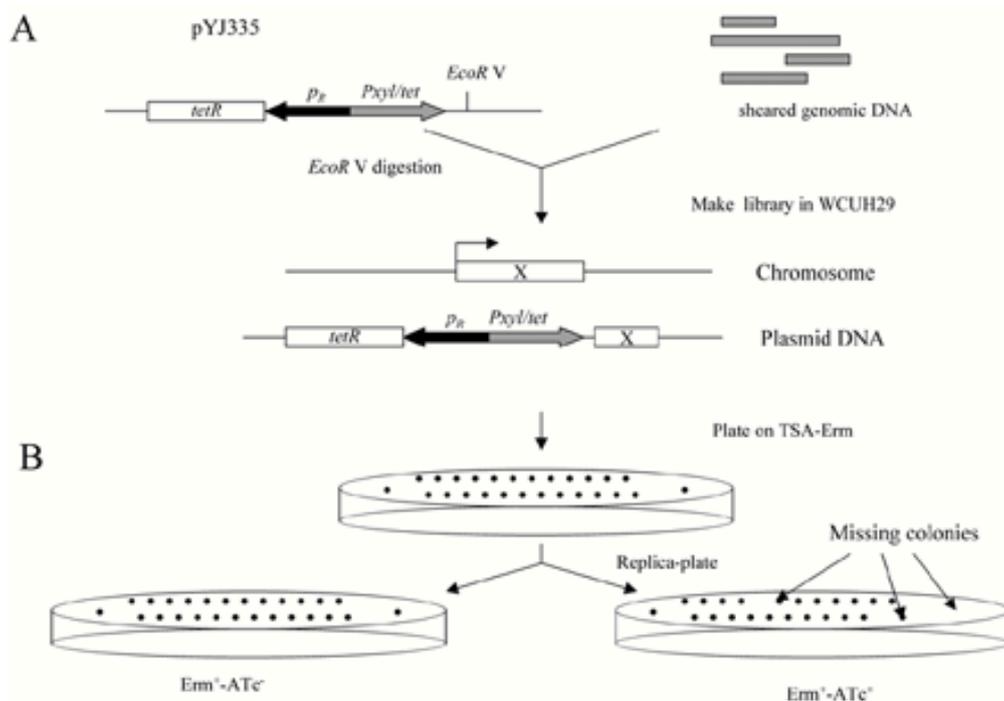


Abb. 7: Antisense RNA Technologie in *S.aureus* WCUH29
A: Herstellung der induzierbaren antisense *S. aureus* library.
B: Screening auf essentielle Gene.
Übernommen aus Ji *et al.* (2001)

Zalacain et al (18) führte Essentialitätsstudien in *S. aureus* mit Allelic Replacement Mutagenesis durch. Die 5' und 3' Flanken der zu untersuchenden Gene wurden mit der ermC Kasette fusioniert und in einen Vektor kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Derivat des pBluescriptIIKS(+), der eine Tetracyclinresistenz als Selektionsmarker enthält. Nach der Transformation in *S. aureus* RN4220 wurde auf Erythromycin resistente Klone selektioniert. Diese wurden anschließend auf target-spezifische Plasmidintegration mittels PCR untersucht. Diese Plasmid Cointegrants wurden dann zurück in *S. aureus* RN4220 beziehungsweise NCTC8325 mit Hilfe der Phagen Φ 11 beziehungsweise Φ 90 transduziert. Dadurch findet eine zweite homologe Integration statt und das Zielgen wird durch die Erythromycinkasette ausgetauscht. Die resultierenden Klone wurden auf Tetracyclinreistenz gescreent. Jene Klone, die erm^R und tet^S waren, wurden auf erfolgreichen allelischen Austausch am entsprechenden Loci mit Southern Blot und PCR-Analyse untersucht.

Tschierske et al (26) beschrieb eine Methode für die Disruption des Zielgenes in *S. aureus*. Dafür wurde ein internes Fragment in einen Shuttle-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält für die Selektion einen Erythromycinresistenz Marker, einen temperatursensitiven Ori für die Replikation in *S. aureus* und eine Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli*. Nach der Klonierung in *E. coli* wurden die Plasmide in den restriktionsnegativen *S. aureus* RN4220 mittels Elektroporation transformiert. Um die chromosomale Integration des Plasmides zu induzieren, wurden die Bakterien bei einem Temperaturshift während des Wachstums von 30°C auf 42°C unterzogen und anschließend geeignete Verdünnungen auf Agarplatten mit Erythromycin ausplattiert und 42°C über Nacht inkubiert. Durch diese Temperaturänderung muss das Plasmid in das Chromosom integrieren um replizieren zu können. Disruption eines essentiellen Genes kann die Überlebensfähigkeit des Bakteriums so weit beeinflussen, dass überhaupt kein Wachstum mehr zu beobachten ist.

Neben *Streptococcus* können auch verschiedene andere Bakteriengattungen wie zum Beispiel *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Bacillus* und *Neisseria* einen Zustand der natürlichen Kompetenz einnehmen. Bei diesem horizontalen Gentransfer können die freien DNA-Moleküle (Plasmid-DNA oder lineare Deletionskassetten) direkt vom Organismus aufgenommen werden (27,28).

1.4. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein humanes Pathogen, das hauptsächlich Erkrankungen der oberen Atemwege verursacht. Die Krankheitsbilder von Pneumokokken sind recht unterschiedlich und reichen von Lungenentzündungen, chronischer Bronchitis bei Menschen mit Vorerkrankung der Lunge, bis hin zu nicht-respiratorischen Erkrankungen wie Ohrenentzündungen und Meningitis. (29).

Seit 1975 gibt es einen drastischen Anstieg der Antibiotikaresistenzen bei Pneumokokken, wodurch eine Behandlung nur mehr mit stärkeren, multiplen und viel teureren Antibiotika erfolgen kann. Früher reichte eine Therapie mit β -Lactamen (Penicillin und Cephalosporin) vollkommen aus. Heute sind mehr als die Hälfte der aus Menschen isolierten *S. pneumoniae* Stämme resistent gegen Penicilline. (30)

Das Genom von verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen ist bereits durchsequenziert worden und ausserdem besitzt *S. pneumoniae* eine natürliche Kompetenz für DNA-Aufnahme und ist daher gut transformierbar.

1.4.1. Competence Stimulating Peptide CSP

Die natürliche Kompetenz bei *S. pneumoniae* wird durch CSP vermittelt. Das Kompetenz stimulierende Peptid in *S. pneumoniae* ist das Genprodukt von *comC* und der Mechanismus wird in Abb. 8 beschrieben.

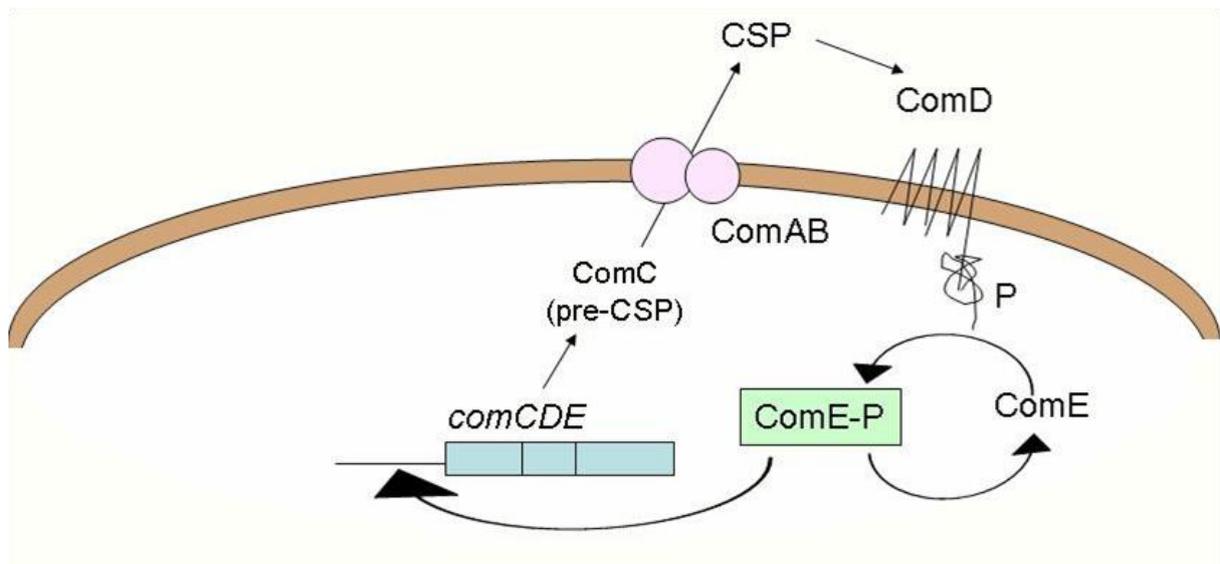


Abb. 8: Modell der quorum sensing Regulation der DNA-Aufnahme mittels CSP
Modifiziert nach Alloing *et al.* (1998)

Das 41 AS lange Propeptid enthält eine N-terminale Gly-Gly Prozessierungsstelle. Das Peptid wird mit Hilfe eines speziellen ABC-Transporters, welcher von *comAB* codiert wird, exportiert und die Signalsequenz vor der Translokation abspaltet. Die proteolytische Domäne des Transporters befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Das reife Peptid ist 17 AS lang. Wenn aufgrund der Zelldichte eine bestimmte Konzentration an aktivem Peptid im extrazellulären Raum sich befindet, bindet dieses an einen Histidin-Kinase-Rezeptor (*comD*), der Teil eines Zwei-Komponenten Regulator Systems ist. Nach Bindung des 17 AS langen aktiven Peptids an den Rezeptor, phosphoryliert dieser den Response-Regulator (*comE*) und dieser Transkriptionsfaktor verursacht die Hochregulation von *comCDE* und anderen Operons, die in der Entwicklung der Kompetenz beteiligt sind (20,31). Bei *S. pneumoniae* werden diese sogenannten quorum-sensing Pheromone von allelischen Varianten von *comC* codiert (Abb. 9).

```
CSP-1 EMRLSKFFRDFILQRKK
CSP-2 EMRISRRIILDFLFLRKK
```

Abb.9: Aminosäuresequenzen von CSP-1 und CSP-2

Je nachdem ob im Genom die Varianten *comC1* oder *comC2* vorliegen, wird CSP-1 beziehungsweise CSP-2 zur Induzierung der Kompetenz benötigt. Ohne aktives Peptid bzw Zugabe von synthetisch hergestelltem 17 AS langen CSP, um eine Transformation gewollt/gezielt herbeizuführen, ist keine DNA-Aufnahme möglich (32). CSP-1 und CSP-2 unterscheiden sich an 8 Positionen in ihrer Aminosäuresequenz. Für den *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 wird für die Transformationen CSP-2 benötigt (Experimente dazu werden nicht beschrieben).

1.5. *Staphylococcus aureus*

Bei *S. aureus* handelt es sich um Gram-positive, Katalase positive Kokken. Sie sind die Hauptursache von Haut- und Wundinfektionen. Auch Infektionen des Herzens (Endocarditis), Infektionen der Knochen (Osteomyelitis), Infektionen des Zentral-Nerven-Systems (z. B.: Gehirnabszesse), Pneumonien und Bakteriämien können von diesem Keim verursacht werden. Bei einem weiteren gefährlichen, aber relativ seltenem, Krankheitsbild handelt es sich um das Toxic Shock Syndrom (TSS). *S. aureus* kann während einer Infektion ein Toxin (Toxic Shock Syndrom Toxin, TSST)

freisetzen, welches von den Epithelzellen absorbiert wird. Dadurch kann das Toxin in die Blutbahn gelangen und induziert eine Immunantwort, die bis zum septischen Schock führen kann.

Bei *S. aureus* handelt es sich um einen Keim der normalen Flora. Die höchste Besiedelung findet man in der Nase vor. Die Kolonisierung mit *S. aureus*, auch mit multiresistenten Stämmen, bereitet gesunden Menschen kaum Probleme. Die Gefährlichen Keime können die Barriere der Normalflora kaum durchbrechen und das Immunsystem kommt gut mit ihnen klar. Probleme gibt es dann, wenn kranke und immungeschwächte Menschen mit diesen Personen, die Träger multiresistenter *S. aureus* sind, in Kontakt kommen. Genau das ist aber die Problematik in den Krankenhäusern. Oftmals ist das Pflegepersonal Überträger und kranke Menschen können angesteckt werden (33).

1.6. *Haemophilus influenzae*

Bei *H. influenzae* handelt es sich um ein kleines, nicht bewegliches Gram-negatives Bakterium aus der Familie der *Pasteurellaceae*. Die Bakterien können als Kokken (verkapselte Formen, z.B.: Typ b) oder auch als lange, pleomorphe Ketten (nicht verkapselte Varianten) vorliegen. Die Keime haben sich gut an den Menschen angepasst und sind in bis zu 75% im Nasopharynx von gesunden und Erwachsenen zu finden. Für das Wachstum benötigt *H. influenzae* einen Vorläufer der Hem-gruppe (Bestandteil der roten Blutzellen). Die komplexen Medien zur Kultivierung von *H. influenzae* enthalten deswegen unter anderem den X-Faktor (Hemin) und den V-Faktor (NAD oder NADP). Ihr Wachstumsoptimum liegt bei 35 – 37°C und einem pH von 7,6. Die Keime wachsen normalerweise im Labor unter anaeroben Bedingungen bei einem CO₂-Gehalt von 5%.

Der Hauptvirulenzfaktor ist die Polysaccharidkapsel von *H. influenzae* Typ b. Die verkapselten Bakterien dringen über die Epithelien des Nasopharynx direkt in die Blutkapillaren ein. Durch die Kapsel sind die Keime resistent gegen Phagozytose und komplement-vermittelte Lyse in nicht immunen Personen.

H. influenzae verursacht eine Vielzahl an Krankheitsbildern wie unter Anderem Bakteriämien, bakterielle Meningitis, Erkrankungen der Knochen, wie zum Beispiel

Osteomyelitis, aber auch Ohrenentzündungen und Erkrankungen der oberen Atemwege (Pneumonien) (34).

H. influenzae besitzt wie *S. pneumoniae* eine natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme und eignet sich daher hervorragend für Essentialitätsstudien. Ebenso sind bereits einige Stämme durchsequenziert worden.

2. Zielsetzung

Die Firma Biovertis konzentriert sich auf die Entwicklung von Antibiotika, die sich durch neuartige Wirkungsmechanismen auszeichnen. Die Identifizierung neuer Wirkstoffziele (Targets) stellt hierfür einen möglichen Weg dar.

Grundlage für die Identifizierung neuer Targets ist das Vorliegen eines sequenzierten Genoms. Über die Sequenz des Genoms kann vor Aufklärung der Essentialität eine Selektion nach verschiedenen Bedingungen vorgenommen werden.

Dies dient einerseits dazu, dass Gene selektioniert werden können, die auch in anderen Bakterienstämmen (z.B. *E. faecalis*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *E. coli*) vorkommen. Dadurch wird die Entwicklung von Antibiotika mit entsprechender Breitbandwirkung ermöglicht.

Andererseits kann auch die Homologie der selektionierten Gene zu *H. sapiens* bestimmt werden. Durch Auswahl nicht-orthologer Sequenzen zu *H. sapiens* kann die Toxizität des zukünftigen Therapeutikums niedrig gehalten werden, da automatisch Genprodukte als Ziele ausgewählt werden, welche im Menschen nicht vorhanden sind.

Des Weiteren sollen sich die potentiellen Targets durch ihre Essentialität (das dem Protein entsprechende Gen ist unbedingt notwendig für das Überleben des Keims) sowie durch eine enzymatische Funktion auszeichnen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollen im ersten Schritt geeigneten Methoden zur Bestimmung der Essentialität von Genen in *S. pneumoniae*, *H. influenzae* und *S. aureus* entwickelt werden. Im zweiten Schritt soll mit diesen Methoden eine Vielzahl an Genen untersucht werden und die Vorhersage der Essentialität evaluiert werden.

Die zu untersuchenden Gene werden nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt. Durch das von der Firma Intercell patentierte Antigen Identifizierungs Programm (AIP) konnte eine Vielzahl neuer Antigene von Pathogenen identifiziert werden. Bei dieser Methode wird die aus dem entsprechenden Mikroorganismus isolierte DNA zufällig fragmentiert und mit Hilfe von Membranproteinen auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert. Dies oberflächenpräsentierten Peptide und

Proteine werden anschließend mit aus gesunden oder infizierten Menschen isolierten Antikörpern gescreent. Das Ziel ist es, jene bakteriellen Epitope zu bestimmen, die mit den menschlichen Antikörpern interagieren. AIP wurde schon bei vielen pathogener Organismen eingesetzt um eine Vielzahl neuer Antigene zu identifizieren.

Die gefundenen Antigene konnten bioinformatisch zu einigen bekannten und konservierten Clustern zusammengefasst werden und wenn sie den Ansprüchen entsprachen, in *S. pneumoniae*, *S.aureus* und *H. influenzae* auf Essentialität untersucht werden.

Aufgrund der vertraglichen festgelegten Verschwiegenheitsklausel mit der Fa. Biovertis kann auf die genauen Details der ausgewählten Gene großteils nicht eingegangen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Ausgewählte Gene

Die eigentlichen Sequenzen und die zu den Genen mit den 1000 bp 5' und 3' Flanken wurden von der Homepage von *The Institute of genomic research* - www.tigr.org - heruntergeladen. Als Template für das Primerdesign für die entsprechenden Methoden wurden folgende durchsequenzierte Spezies herangezogen:

Streptococcus pneumoniae TIGR4

Staphylococcus aureus COL

Haemophilus influenzae Rd KW20

3.2. Oligonukleotide

Die DNA-Oligonucleotide-Synthese wurde bei vbc-genomics oder sigma genosys durchgeführt. Hierfür ist es notwendig, die Primer vor Verwendung auf 10µM mit 1mM Tris pH 8,0 zu verdünnen. Die lyophilisierten Primer in dem in den mitgelieferten Syntheseberichten angegebenen Volumen für 100µM mit 1mM Tris pH 8,0 auflösen und mit demselben Puffer 1:10 weiterzuverdünnen (z.B.: 20µl 100µM Primer +180µl 1mM Tris pH 8,0).

Generell wurde versucht die Primer so zu designen, dass ein 50%iger G/C Anteil vorhanden ist.

3.2.1. Primerdesign für *S. pneumoniae* Deletions - Konstrukte

Die eingesetzte PCR-Methode zur Herstellung der Deletionskassetten wird als nested PCR oder verschachtelte PCR oder Fusions PCR bezeichnet. Als erstes wird das Kanamycinresistenzgen mittels spezifischer Primer amplifiziert. Als Template hierfür dient das aphIII-Gen. Anschließend werden die 1kb 5' und 3' Flanken zum Zielgen amplifiziert. Der reverse-Primer (antisense) der 5' Flanke und der forward-Primer (sense) der 3' Flanke besitzen jeweils einen 22 Nukleotid langen overhang aus der leading bzw. lagging strand Sequenz des Kanamycinresistenzgenes (siehe Abb. 10).

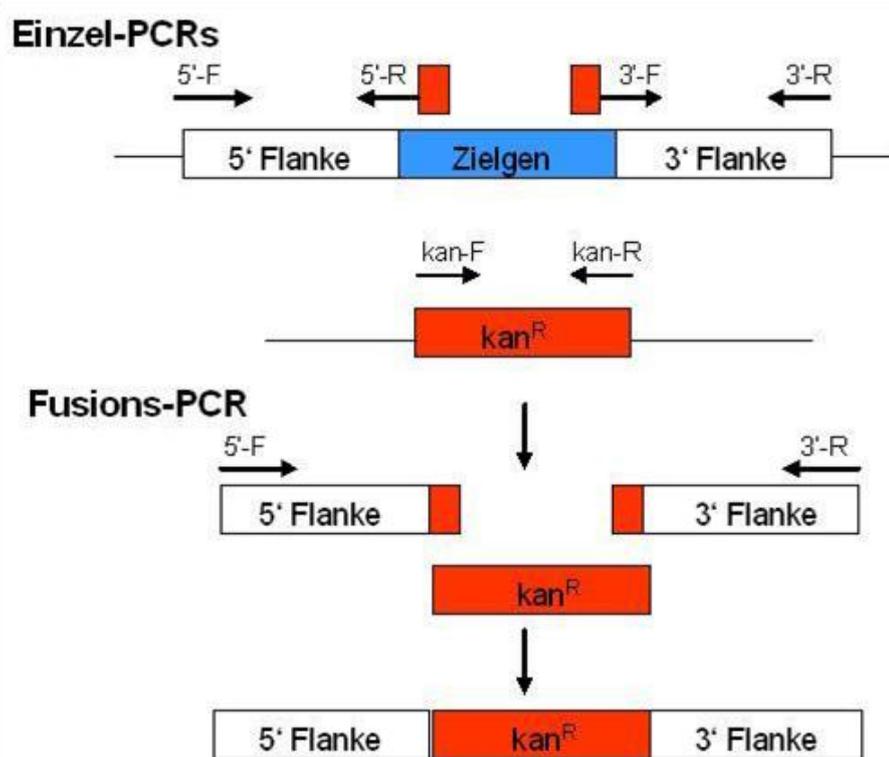


Abb.10: Prinzip der Fusions-PCR; F: forward (=sense), R: reverse (=antisense)

Primer für Kanamycinresistenzkassette:

kan forward: 5'-GGTTTCAAATCGGCTCCGTCG-3'

kan reverse: 5'-ACAAATTCCTCGTAGGCGCTCG-3'

generelles Primerdesign für Deletionskonstrukte:

5' Flanke

forward: 5'-genspezifische Sequenz-3'

reverse: 5'- CGACGGAGCCGATTTTGAACC + genspezifische Sequenz -3'

3' Flanke

forward: 5'- CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT + genspezifische Sequenz -3'

reverse: 5'- genspezifische Sequenz-3'

3.2.2 Primerdesign für *S. pneumoniae* Disruptions - Konstrukte

Es wird dabei geachtet, dass im zu untersuchenden Gen intern keine natürlich vorkommende BamHI Schnittstelle vorhanden ist. Falls dies der Fall ist, wird jener Bereich ausgewählt, der diese Schnittstelle nicht enthält. Ein verschieben des gewünschten Bereiches ist insofern möglich, da nicht das komplette Gen für eine

homologe Rekombination nötig ist. Generell wird versucht, ein ca 500bp Fragement auszuwählen. Bei sehr langen Genen werden 2 verschiedene Konstrukte unterschiedlicher Bereiche hergestellt.

generelles Primerdesign für *S. pneumoniae*-Disruptionskonstrukte (inklusive BamHI Schnittstelle)

forward: 5'-ATATATGGATCC + genspezifische Sequenz-3' (leading strand)

reverse: 5'-ATATATGGATCC + genspezifische Sequenz-3' (lagging strand)

3.2.3 Primerdesign für *S. aureus* Duplikations und Disruptions - Konstrukte

Für die Duplikationskonstrukte wurden die Primer so gewählt, dass das daraus resultierende PCR-Produkt mit dem Startcodon des Gens beginnt und mit dem Stoppcodon endet. Für die Disruptionskonstrukte wurde ein ca 500bp langen Teil des Gens zu amplifizieren. Zusätzlich wurde auch überprüft, dass im zu untersuchenden Gen intern keine natürlich vorkommende BamHI Schnittstelle vorhanden ist, was in keinem der zu untersuchenden Gene der Fall war.

generelles Primerdesign für *S.aureus*-Deletions und Disruptionskonstrukte (inklusive BamHI Schnittstelle)

forward: 5'-ATATATGGATCC + genspezifische Sequenz-3' (leading strand)

reverse: 5'-ATATATGGATCC + genspezifische Sequenz-3' (lagging strand)

3.2.4. Primerdesign für *S. aureus* Kontroll-PCR's

Um die Integration der Duplikations und Disruptionskonstrukte an der korrekten Stelle ins Genom von *S. aureus* RN4220 zu überprüfen, werden Primer designed, die knapp vor dem entsprechenden Startcodon binden.

3.2.5. Primerdesign für *H. influenzae* Deletions - Konstrukte

Für die Etablierung der geeigneten Deletionskonstrukte wurde die uptake-Sequenz (US) an verschiedene Positionen gesetzt. Ausserdem wurden zwei verschiedene Resistenzkassetten verwendet - Kanamycin und Erythromycin.

Wie bei den Fusions-PCR's für *S. pneumoniae* wurden im ersten Schritt die flankierenden 1000bp 5' und 3' zum Gen amplifiziert und in einer weiteren PCR mit der Antibiotikaresistenzgenkassette mittels PCR fusioniert.

Erythromycinkassette:

forward: 5'-CGAAACAGCAAAGAATGGCG-3'

forward + **US**: 5'-**AAGTGCGGTCA**CGAAACAGCAAAGAATGGCG-3'

reverse: 5'- CCTTTAGTAACGTGTAAC TTTC -3'

reverse + **US**: 5'- **TGACCGCACTT**CCTTTAGTAACGTGTAAC TTTC -3'

Kanamycinkassette:

forward: 5'- GGTTTCAAATCGGCTCCGTTCG -3'

forward + **US**: 5'- **AAGTGCGGTCA**GGTTTCAAATCGGCTCCGTTCG -3'

reverse: 5'- ACAAATTCCTCGTAGGCGCTTCG -3'

reverse + **US**: 5'- **TGACCGCACTT**ACAAATTCCTCGTAGGCGCTTCG -3'

generelles Primerdesign für Deletionskonstrukte:

Nach den entsprechenden Vorversuchen wurde sich für das folgende Primerdesign mit der Erythromycinkassette entschieden:

5' Flanke

forward: 5'-genspezifische Sequenz-3'

reverse + **US**: 5'- TGCTGTTTCG**TGACCGCACTT** + genspezifische Sequenz -3'

3' Flanke

forward: 5'- GAAAGTTACAGTTACTAAAGG + genspezifische Sequenz -3'

reverse: 5'- genspezifische Sequenz-3'

3.2.6. allgemeine Primer

Zur MCS flankierende Primer für pJDC9 und pAUL-A:

M13 forward: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

M13 reverse: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Primer zur Sequenzierung des temperatur sensitiven ori von pAUL-A

Sequenzierprimer 1: 5'-TCAGATGCAACCGGTATTC-3'

Sequenzierprimer 2: 5'- AGCATGCCAGTGCTGTCTATC-3'

Sequenzierprimer 3: 5'- ATGCTTCACATGGACGATCC-3'

Sequenzierprimer 4: 5'- TTCCTTTTTGCGTGATGC-3'

3.3. verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die in diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 und die Plasmide in Tabelle 3, 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 2: die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> -, <i>m_k</i> -), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ -, $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169}$, $\Phi 80\text{dlacZ } \Delta\text{M15}$	Laborstammsammlung
<i>S. aureus</i> RN4220	NCTC 8325-4-r; Restriktionsmutante mit 11 Bp-Deletion in <i>rsbU</i>	Laborstammsammlung
<i>S. aureus</i> COL	MRSA, hohe Methicillin-Resistenz, Tetrazyklin-Resistenzplasmid	Laborstammsammlung
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	Serotyp 4 (ATCC BAA-334)	LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland
<i>H. influenzae</i> Rd KW20	(ATCC 51907, DSM 11121)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 3: die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für *S. pneumoniae*

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pJDC9	Suizidvektor für <i>S. pneumoniae</i>	Laborstock
pJDC.SPxx	pJDC9 + internes Fragment von SPxx für Disruption	diese Arbeit
pJDC.SPxx	pJDC9 + internes Fragment von SPxx für Disruption	diese Arbeit

Tabelle 4: die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für *S. aureus*

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pAUL-A	Suizidvektor für <i>S. aureus</i>	Laborstock
pAUL.SAcxxxx DUP	pAUL-A + gesamtes Gen von SACOLxxxx für Duplikation	diese Arbeit
pAUL.SAcxxxx DIS	pAUL-A + internes Fragment von SACOLxxxx für Disruption	diese Arbeit

Tabelle 5: die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Antibiotikaresistenzen

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pAT21a	aph(3')-III für Kanamycinresistenz	
pJDC9	ermB für Erythromycinresistenz	

3.4. Chemikalien und Kits und Bezugsquellen

Agar für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2266
Agarose, SeqKem LE	Biozym, Oldendorf, Deutschland	840004
BamHI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#ER0051
BamHI 10x Puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#ER0051
BHI - Medium	Sigma, Steinheim, Deutschland	53286
Blutagarplatten	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.13414
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt, Deutschland	A2331.0005
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Rothm Karlsruhe, Deutschland	5239.2
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland	M0290S
Competence Stimulating Peptide (CSP)	Intercell, Wien, Österreich	lpep1803
Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinheim, Deutschland	D8418
DNA 1kb Längenmarker	Invitrogen, Lofer, Österreich	15615-024
DNA 1kb Plus Längenmarker	Invitrogen, Lofer, Österreich	10787-018
dNTP, 2mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#R0241
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz	03610
Erythromycin	Sigma, Steinheim, Deutschland	E-6376
Essigsäure, 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3738.4
Ethanol, 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland	100986
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Sigma, Steinheim, Deutschland	E1510-10ml
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland	1732650
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega, Mannheim, Deutschland	A1120
Glycerin, 100%	Sigma, Steinheim, Deutschland	G-6279
HCl, ~37%	Fluka, Buchs, Schweiz	84420
Hemin, Faktor X	Sigma, Steinheim, Deutschland	H3821
Isopropanol, 100%	Fluka, Buchs, Schweiz	59300
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	T832,3
KAc	Sigma, Steinheim, Deutschland	P-5708
KCl	Fluka, Buchs, Schweiz	60130
KOH	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.05033
LB-Agar	Sigma, Steinheim, Deutschland	L2897
LB-Medium	Sigma, Steinheim, Deutschland	L3022
Lysozym	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8259.2
MnCl ₂ x 4H ₂ O	Sigma, Steinheim, Deutschland	M-3634
MOPS	Fluka, Buchs, Schweiz	69947
NAD, Nicotinamidinukleotid, Faktor V	Sigma, Steinheim, Deutschland	N-7004
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06482
Oligonukleotide	vbc-genomics, Wien, Österreich	
Oligonukleotide	Sigma genosys, xxx, Deutschland	
QIAEXII Gel Extraction Kit (500)	QIAGEN, Hilden, Deutschland	20051

QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	QIAGEN, Hilden, Deutschland	27106
QIAquick PCR Purification Kit (250)	QIAGEN, Hilden, Deutschland	28106
Sucrose	Sigma, Steinheim, Deutschland	S9378
T4 DNA Ligase 10x Puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#EL0011
T4 DNA Ligase, 5U/µl	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#EL0011
Taq Polymerase Puffer (10x)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#EP0404
Taq Polymerase, 1U/µl	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	#EP0404
Thod-Hewitt-Broth	Becton-Dickson	211736
Trisma Base	Sigma, Steinheim, Deutschland	T-1503

Tabelle 6: Chemikalien und Bezugsquellen

3.5. Geräte

Autoklaven	HP Varioklav
Brutschränke	Heraeus, Bender
Elektrophoresekammern	BioRad
Elektroporator	BioRad
Magnetrührer	IKA
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikrowellengerät	Siemens
Netzgeräte Power Pac 300	BioRad
PCR-Thermocycler (T3 Thermocycler)	Biometra
pH-Meter WTW pH 523,	Metrohm-Herisau
Photometer	Eppendorf
Schüttelinkubator (Clim-O-Shake)	InforsBraun-Melsungen
Sterilarbeitsbank Hera Safe	Thermo
Tisch-Mixer Eppendorf, Mixer 5436	Eppendorf
UV-Fotoanlage GelDoc	UVP
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Waagen Sartorius 2403,	Sartorius Feinwaage
Zentrifugen Megafuge 1.0 R; Minifuge RF	Heraeus
Zentrifuge 5415C	Eppendorf

Tabelle 7: Geräte

3.6. Lösungen

1N KOH

2,81g KOH einwiegen und in ungefähr 40ml deionisiertem Wasser lösen. Da beim Auflösen eine starke Hitzeentwicklung eintritt, soll vor dem Auffüllen auf 50ml mit deionisiertem Wasser die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Die 1N KOH wird zum Einstellen des pH Wertes verwendet.

1N NaOH

2,0g NaOH einwiegen und in ungefähr 40ml deionisiertem Wasser lösen. Da beim Auflösen eine starke Hitzeentwicklung eintritt, vor dem Auffüllen auf 50ml mit deionisiertem Wasser die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Die 1N NaOH wird zum Einstellen des pH Wertes verwendet.

10% Essigsäure

5ml 100%Essigsäure vorsichtig zu 45 ml deionisiertem Wasser pipetieren. Die 10%ige Essigsäure wird zum Einstellen des pH-Wertes verwendet.

TfBI und TfBII für Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α

TfBI: 30mM KAc (= 1,47g für 500ml Puffer)

50mM MnCl₂ (= 4,9475g für 500ml Puffer)

100mM KCl (= 3,728g für 500ml Puffer)

10mM CaCl₂ (= 0,7351g für 500ml Puffer)

15% Glycerin (= 75ml für 500ml Puffer)

Die angegebenen Mengen an Komponenten einwiegen und in etwa 2/3 des Endvolumens deionisiertem Wasser auflösen, die entsprechende Menge an Glycerin zugeben, mit 10% Essigsäure auf pH5,8 einstellen und auf angegebenes Endvolumen mit desionisiertem Wasser auffüllen. Die Lösungen sterilfiltrieren und bei 5 \pm 3°C aufbewahren. Der Puffer ist für einige Monate haltbar.

TfBII: 10mM MOPS (= 0,2097g für 100ml Puffer)
75mM CaCl₂ (= 1,1027g für 100ml Puffer)
10mM KCl (= 0,0746g für 100ml Puffer)
15% Glycerin (= 15ml für 100ml Puffer)

Die angegebenen Mengen an Komponenten einwiegen und in etwa 2/3 des Endvolumens deionisiertem Wasser auflösen, die entsprechende Menge an Glycerin zugeben, mit 1N KOH auf pH6,5 einstellen und auf angegebenes Endvolumen mit desionisiertem Wasser auffüllen. Die Lösungen sterilfiltrieren und bei 5±3°C aufbewahren. Der Puffer ist für einige Monate haltbar.

1M Tris pH8.0

121,1g Tris in ~700ml deionisiertem Wasser lösen und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 8.0 einstellen. Mit deionisiertem Wasser auf 1000ml auffüllen und autoklavieren.

Für einen 10mM Tris pH8.0 Puffer werden 50ml deionisiertes Wasser mit 500µl 1M Tris pH8,0 vermengt.

Für den 1mM Tris pH8,0 Puffer für das Auflösen und auf 10µM verdünnen der Oligonukleotide werden 50ml deionisiertes Wasser mit 50µl 1M Tris pH8,0 vermengt.

20xTAE

96,8 g Tris Base
23 ml 100% Essigsäure
7,445 g EDTA
ad 1000ml mit deionisiertem Wasser

Der 1x TAE-Puffer für die Agarosegele wurde aus 50 ml 20xTAE und 950 ml deionisiertem Wasser hergestellt.

1%Agarose in 1xTAE:

1g Agarose/100ml 1xTAE, aufkochen, auf etwa 50°C abkühlen lassen
3µl Ethidiumbromid/100ml fertigem Gel zugeben

60% Glycerin

60ml 100% Glycerin + 40ml deionisiertes Wasser, aliquotieren und autoklavieren
Das so hergestellte 60%ige Glycerin ist ungeöffnet für mindestens 1Jahr haltbar.

1% CaCl₂

Für das Kompetenzmedium wird 1%iges CaCl₂ benötigt. Dafür werden 0,5g CaCl₂ in 50ml deionisiertem Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die so hergestellte Lösung ist für 6 Monate haltbar.

NAD, 7,5mg/ml

187,5mg in 25ml dH₂O auflösen und sterilfiltrieren, aliquotieren und bei ≤-15°C aufbewahren.

Hemin, 7,5mg/ml

187,5mg in 500µl 1N NaOH auflösen, mit dH₂O auf 25ml auffüllen und sterilfiltrieren, aliquotieren und bei ≤-15°C aufbewahren.

Erythromycin, 50mg/ml

1g Erythromycin in 20ml 100% Ethanol lösen, aliquotieren und bei ≤-15°C aufbewahren.

Kanamycin, 50mg/ml

1g Kanamycinsulfat in 20ml deionisieren, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei ≤-15°C aufbewahren.

Lysozym, 10mg/ml

100mg Lysozym in 10ml deionisiertem Wasser auflösen, sterilfiltrieren und bei +5±3°C aufbewahren.

500mM EDTA

73,06g EDTA in ~400ml deionisiertem Wasser lösen und mit 1N NaOH auf einen pH von 8,0 einstellen. Mit deionisiertem Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren.

0,5M Sucrose

85,58g Sucrose in 500ml deionisiertem Wasser lösen und sterilfiltrieren.

70%Ethanol

70ml Ethanol mit 30ml deionisiertem Wasser vermengen.

Auftragspuffer für DNA Agarosegele

25ml 100%iges Glycerin wird mit 25ml 10mM Tris pH8.0 vermengt, mit soviel Bromphenolblau versetzt, das eine gewünschte Blaufärbung eintritt, aliquotiert und bei $\leq -15^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zum Auftragen der DNA auf ein Agarosegel wird diese zuvor mit ungefähr 1/5 des Volumens versetzt.

DNA Längenmarker (Abb. 5)

Der 1kb DNA Marker beziehungsweise der 1kb Plus DNA Marker werden mit Auftragspuffer und deionisiertem Wasser so verdünnt, das in 10 μl Endvolumen 0,5 μg Marker enthalten sind (z.B.: 50 μl DNA-Marker (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 100 μl Auftragspuffer + 350 μl dH₂O). Den so vorbereiteten Marker bei $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ aufbewahren.

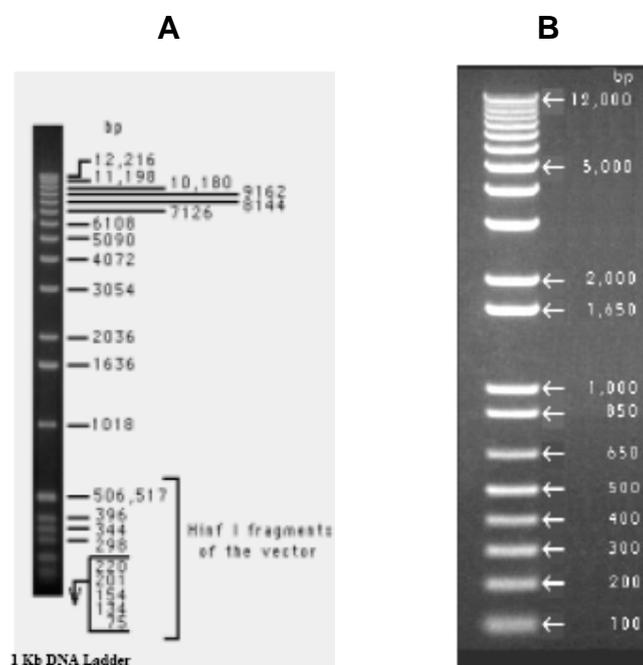


Abb.11: A: 1kb DNA Marker, B: 1kb Plus DNA Marker

3.7. Medien

LB Medium

Das LB-Medium ist eine Pulverfertigmischung bestehend aus:

- 10g/l Tryptone (pankreatischer Verdau von Casein)
- 5g/l Yeast extract
- 5g/l NaCl

20g LB-Medium einwiegen und in 1000ml deionisiertem Wasser lösen. In geeignete Mengen aliquotieren und anschließend autoklavieren. Das so hergestellte Medium ist für 6 Monate haltbar. Bei Bedarf Erythromycin (Erm) in einer Konzentration von 200µg/ml zugeben (z.B.: 500ml LB-Medium + 2ml Erythromycin (Stock 50mg/ml)). Das LB-Erm Medium bei $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ aufbewahren und maximal 4 Wochen verwendet.

LB Agar

Der LB-Agar ist eine Pulverfertigmischung bestehend aus:

- 10g/l Tryptone (pankreatischer Verdau von Casein)
- 5g/l Yeast extract
- 5g/l NaCl
- 15g/l Agar

17,5g LB-Agar einwiegen und mit 500ml deionisiertem Wasser vermengen und anschließend autoklavieren. Der so hergestellte Agar ist für 6 Monate haltbar. Bei Bedarf den Agar in der Mikrowelle aufkochen bis er sich vollständig gelöst hat. Den gelösten LB-Agar auf etwa 50°C abkühlen lassen. Wenn benötigt Erythromycin in einer Konzentration von 200µg/ml zugeben (z.B.: 500ml LB-Agar + 2ml Erythromycin, 50mg/ml) und in Petrischalen gießen. Die LB-Erm Platten bei $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ aufbewahren. Sie können bis zu 4 Wochen verwendet werden.

BHI Medium

Brain Heart Infusion (BHI) ist eine Pulverfertigmischung bestehend aus:

- 5,0g/l Beef Heartinfusion
- 12,5g/l Calf Braininfusion
- 2,5g/l Disodiumhydrogenphosphat
- 10,0g/l Pepton
- 2,0g/l Dextrose
- 5,0g/l Natriumchlorid

37g BHI einwiegen und in 1000ml deionisiertem Wasser lösen. In geeignete Mengen aliquotieren und anschließend autoklavieren. Das so hergestellte Medium ist für 6 Monate haltbar.

Bei Bedarf Erythromycin (Erm) in einer Konzentration von 10µg/ml zugeben (z.B.: 500ml BHI-Medium + 100µl Erytromycin (Stock 50mg/ml)). Das BHI-Erm Medium bei 5±3°C aufbewahren und maximal 4 Wochen verwendet.

BHI Agar

Für die Herstellung von BHI-Agar Platten mit entsprechenden Zusätzen wird fertiges BHI-Medium mit 1,5% Agar versetzt und autoklaviert.

6,0g Agar einwiegen und mit 400ml fertigem BHI Medium vermengen und anschließend autoklavieren. Der so hergestellte Agar ist für 6 Monate haltbar. Bei Bedarf den Agar in der Mikrowelle aufkochen bis er sich vollständig gelöst hat. Den gelösten BHI-Agar auf etwa 50°C abkühlen lassen. Wenn benötigt Erythromycin in einer Konzentration von 10µg/ml zugeben (z.B.: 400ml BHI-Agar + 80µl Erytromycin, 50mg/ml) und in Petrischalen gießen. Die BHI-Erm Platten bei +5±3°C aufbewahren. Sie können bis zu 4 Wochen verwendet werden.

sBHI Medium und Agar

Für die Arbeiten mit *H. influenzae* ist die Herstellung eines komplexeren Mediums notwendig. Die Keime benötigen für das Wachstum zusätzlich den X-Faktor Hemin und den V-Faktor NAD. Das Medium und der Agar werden jedesmal bei Verwendung frisch hergestellt, da diese Zusätze nur eine begrenzte Haltbarkeit zeigen und bei längerer Lagerung des fertigen Mediums bzw Agars kein optimaler Wachstum der Keime zu beobachten ist.

Zusammensetzung des sBHI-Mediums

BHI-Medium

NAD, 15µg/ml (z.B.: 20µl eines 7,5mg/ml Stocks für 10ml BHI Medium)

Hemin, 15µg/ml (z.B.: 20µl eines 7,5mg/ml Stocks für 10ml BHI Medium)

Zusammensetzung des sBHI-Agars

BHI-Medium

1,5% Agar

NAD, 15µg/ml (z.B.: 400µl eines 7,5mg/ml Stocks für 200ml BHI Agar)

Hemin, 15µg/ml (z.B.: 400µl eines 7,5mg/ml Stocks für 200ml BHI Medium)

Bei Bedarf kann noch entsprechendes Antibiotikum zugesetzt werden.

THB Medium

Todd Hewitt Broth (THB) ist eine Pulverfertigmischung bestehend aus:

3,1g/l Heartinfusion

20,0g/l Pepton

2,0g/l Dextrose

2,0g/l Natriumchlorid

0,4g/l Natrimphosphat

2,5g/l Natriumcarbonat

30g Todd Hewitt Broth einwiegen und in 1000ml deionisiertem Wasser lösen. In geeignete Mengen aliquotieren und anschließend autoklavieren. Das so hergestellte Medium ist für 6 Monate haltbar.

Competence Stimulating Peptide (CSP)

Das Peptid wurde in lyophilisierter Form übernommen. Das CSP wurde in DMSO gelöst (Endkonzentration: 10mg/ml) und bei $\leq -15^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Das gelöste Peptid wurde jedes Mal frisch vor Verwendung im Kompetenzmedium 1:1000 auf 10ng/ μl in THB verdünnt (z.B.: 1 μl CSP + 999 μl THB).

Kompetenzmedium

Das Kompetenzmedium wird jedes Mal frisch vor der Transformation hergestellt.

1x Ansatz: 166 μl THB

10 μl CSP (10ng/ μl)

2 μl 1%CaCl₂

Blutagarplatten mit entsprechendem Antibiotikum

Kanamycin: 5mg/Platte mindestens 1h vor Verwendung aufbringen

Erythromycin: 10 μg /Platte mindestens 1h vor Verwendung aufbringen

3.8. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme

Da in allen untersuchten Genen keine natürlich vorkommende BamHI Schnittstelle vorhanden war, konnte dieses Enzym für die Klonierung der Disruptionskonstrukte und Duplikationskonstrukte verwendet werden.

Um ein Religieren des mit BamHI geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau mit CIAP behandelt.

Zur Ligation der Disruptionsfragmente in den entsprechenden Vektor wurde T4 DNA Ligase verwendet.

3.9. Methoden

3.9.1. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α

Einen Tag vor der Herstellung der chemisch kompetenten Bakterien DH5 α für Einzelkolonien auf LB-Agar Platten ohne Antibiotika ausstreichen und 16-24h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubieren.

Am nächsten Tag 5ml auf 37°C vorgewärmtes LB Medium mit einer Einzelkolonie DH5α inokulieren und bei 175rpm und 37°C schütteln lassen. Wenn die Kultur deutlich trüb wird (OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,6, ~3h) mit 20ml auf 37°C vorgewärmten LB-Medium verdünnen. Bei 175rpm und 37°C weiterschütteln lassen und nach ~1h die Kultur mit weiteren 100ml auf 37°C vorgewärmten LB-Medium verdünnen und wie vorhin beschrieben weiterschütteln lassen. Die Kultur nach einer weiteren Stunde nochmals mit ~500ml auf 37°C vorgewärmten Medium verdünnen und bis zu einer OD₆₀₀=0,6 bei 175rpm und 37°C weiterwachsen lassen.

Die DH5α Kultur rasch in Eiswasser abkühlen und bei 4000rpm für 15min bei +4°C abzentrifugieren. Den Überstand abgießen, das Pellet in 100ml eiskaltem TfBI resuspendieren und wie vorhin abzentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet in 15ml eiskaltem TfBII resuspendieren. Die chemisch kompetenten DH5α zu 50µl in auf Eis vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotieren und nach 15min bei ≤-60°C wegfrieren.

3.9.1.1. Transformation in chemisch kompetente *E.coli* DH5α

Eisgekühlte 0,2µl – 1µl DNA oder 20µl eisgekühlten Ligationsansatz zu je 50µl auf Eis aufgetauten chem. komp. DH5α pipettieren und für 5 bis 30min auf Eis inkubieren. Der Hitzeschock wird für 5min bei 37°C im Thermomixer durchgeführt. Anschließend mit eiskaltem LB-Medium auf 500µl Endvolumen verdünnen. Die Transformationsansätze bei 37°C für mindestens 45min im Thermomixerschüttler bei 1400rpm schütteln lassen. Danach die Trafos bei 4000rpm für 4min abzentrifugieren, den Überstand abgießen, das Pellet im restlichen Medium resuspendieren und auf LB-Agar Platten mit Erythromycin ausplattieren. Die Platten für 16 bis 44h bei 37°C inkubieren.

3.9.2. Herstellung elektrokompetenter *S. aureus* RN4220

Einen Tag vor der Herstellung der chemisch kompetenten Bakterien die *S. aureus* RN4220 für Einzelkolonien auf BHI-Agar Platten ohne Antibiotika ausstreichen und 16-24h bei 37°C inkubieren.

Am nächsten Tag 20ml auf 37°C vorgewärmtes BHI Medium mit einer Einzelkolonie *S. aureus* RN4220 inokulieren und bei 175rpm und 37°C schütteln lassen. Wenn die Kultur deutlich trüb wird (nach ca 3h) mit frischem 37°C warmen BHI Medium auf

200ml verdünnen. Wenn die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 1 erreicht (~2h bis 2,5h) bei 4500rpm für 15min bei +4°C abzentrifugieren. Den Überstand abgießen, das Pellet in 100ml eiskaltem 0,5M Succrose resuspendieren und bei 4500rpm für 15min bei +4°C abzentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet in 50ml 0,5M Succrose resuspendieren. Nochmals bei 4500rpm für 15min bei +4°C abzentrifugieren. Die elektrokompetenten *S. aureus* RN4220 in 10ml 0,5M Succrose resuspendieren zu 90µl aliquotieren und bei ≤-60°C wegfrieren.

3.9.2.2. Transformation in elektrokompetente *S. aureus* RN4220

0,2µl – 2µl DNA werden zu je 40µl auf Eis aufgetauten elektrokompetenten *S. aureus* RN4220 pipettieren und für 10min bei RT inkubiert. Der DNA/*S. aureus* RN4220 Mix wird anschliessend in eine Elektroporationsküvette umpipettiert und auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgt bei 2300kV. Sofort nach der Elektroporation werden auf 30°C vorgewärmtes BHI Medium dazupipettiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführen. Nach ca 3 stündiger Inkubation bei 30°C unter schütteln bei RT für 4min bei 4000rpm abzentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet im im Reaktionsgefäß verbliebenen Medium resuspendieren und auf BHI-Agar Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattieren. Anschließend die Platten für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubieren.

3.9.3. PCR-Ansätze

Für die Amplifikation der Disruptionsfragmente und der 1kb und 3kbp Fragmente wurde das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Kontroll-PCRs wurden mit Taq Polymerase durchgeführt.

3.9.3.1.PCRs für Klonierungen

2µl genom DNA *S.pneumoniae* TIGR4 (5ng/µl)

5µl 10x Expand High Fidelity PCR Puffer

5µl 2mM dNTPs

2µl 10µM Primer 1

2µl 10µM Primer 2

0,5µl Expand High Fidelity Enzym Mix

33,5µl dH₂O

PCR-Programm

94°C 2min
94°C 30sek }
53°C 30sek } 35x
72°C 90sek }
72°C 8min

3.9.3.2. PCRs für Kolonie-PCRs

5µl dH₂O je PCR-tube vorlegen, mit einem sterilen Zahnstocher etwas von der entsprechenden Kolonie im vorgelegten dH₂O verquirren.

+ je 10µl PCR-Mix dazu

1xPCR-Mix: 1,5µl 10x Taq PCR Puffer
1,5µl 2mM dNTPs
0,25µl 10µM Primer 1
0,25µl 10µM Primer 2
0,3µl Taq Polymerase (1U/µl)
5,3µl dH₂O

PCR-Programm

94°C 2min
94°C 30sek }
53°C 30sek } 35x
72°C 90sek }
72°C 8min

3.9.3.3. PCRs für 1kb Fragmente

Als Template für die 1kb Fragmente dient für *S. pneumoniae* TIGR4 genomische DNA (5ng/µl).

Die PCR's für *S. aureus* RN4220 und *H. influenzae* Rd KW20 werden direkt von einer Bakteriensuspension angesetzt. Dafür wird eine Kolonie in 100µl dH₂O mit einem sterilen Zahnstocher verquirrt und für 10min bei 94°C erhitzt. Diese Bakteriensuspension kann für einige Wochen auf +4°C aufbewahrt werden.

0,5µl Template
1,25µl 10x Expand High Fidelity PCR Puffer
1,25µl 2mM dNTPs
0,5µl 10µM Primer 1
0,5µl 10µM Primer 2
0,125µl Expand High Fidelity Enzym Mix
8,375µl dH₂O

PCR-Programm

94°C 2min
94°C 30sek }
53°C 30sek } 35x
72°C 90sek }
72°C 8min

3.9.3.4. PCRs für 3kbp Fragmente (Deletionskassetten)

Alle Fragmente werden durch Gel-Extraktion aufgereinigt um die eingesetzten Primer so weit wie möglich zu entfernen. Im darauffolgenden PCR-Ansatz werden die beiden Flanken und die Resistenzkassette mit dem 5' sense und dem 3' antisense Primer eingesetzt.

1,5µl 1kb 5' Flanke
1,5µl kan^R-kassette
1,5µl 1kb 3' Flanke
2,5µl 10x Expand High Fidelity PCR Puffer
2,5µl 2mM dNTPs
0,75µl 10µM Primer 1
0,75µl 10µM Primer 2
0,25µl Expand High Fidelity Enzym Mix
13,75µl dH₂O

PCR-Programm

94°C 2min
94°C 30sek }
51°C 30sek } 35x
68°C 3min }
68°C 8min

3.9.4. DNA-Isolierung

3.9.4.1. Isolierung der genomischen DNA aus *S.pneumoniae* TIGR4

Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit dem wizard genomic Kit laut Herstellerprotokoll durchgeführt. 3ml einer Übernachtskultur von *S.pneumoniae* TIGR4 (OD₆₀₀ ~ 1,2) für 3min bei 13200rpm abzentrifugieren und das Pellet in 480µl 50mM EDTA und 120µl Lysozym (10mg/ml) resuspendieren und für 60min bei 37°C inkubieren. Nach Abzentrifugieren bei 13200rpm für 3min das Pellet in 600µl Nuclei Lysis Solution resuspendieren und für 5min bei 80°C inkubieren. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) 0,15µl RNase (100mg/ml) zugeben und für 15min bei 37°C inkubieren. Erneut auf RT abkühlen lassen und mit 200µl Protein Precipitation Lösung versetzen, vortexen und für 5min auf Eis inkubieren. Für 3min bei 13200rpm abzentrifugieren und den Überstand in ein neues Eppi überführen. Die DNA mit 600µl Isopropanol fällen und für 3min bei 13200rpm abzentrifugieren. Die pelletierte DNA mit 600µl 70% Ethanol waschen und erneut für 2min bei 13200rpm abzentrifugieren. Das DNA-Pellet bei RT trocknen lassen und in 100µl 10mM Tris pH8,0 auflösen. Die OD bei 260nm messen und einen Teil der DNA auf 5ng/µl mit dH₂O verdünnen. DNA bei Nichtverwendung bei ≤-15°C aufbewahren.

3.8.4.2. Isolierung der Miniprep DNA aus *E. coli* DH5α

Die DNA-Isolierung erfolgt laut Herstellervorschrift QIAGEN Miniprep Kit. Ungefähr 7ml o/n Kultur werden bei 4000rpm für 10min abzentrifugiert. Das Pellet in 250µl Puffer P1 (mit 100µg/ml RNase) resuspendieren, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführen, mit 250µl Puffer P2 versetzen und nach Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes für 4min bei RT inkubieren. Anschließend 350µl Puffer P3 dazupipettieren und nach erneutem Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes für 10min bei 13200rpm abzentrifugieren. Den Überstand in ein QIASpin Säulchen pipettieren und für 1min bei 13200rpm abzentrifugieren. Durchfluss verwerfen, 1x mit 500µl Puffer PB und 2x mit je 500µl Puffer PE waschen. Dazwischen immer für 1min

bei 13200rpm zentrifugieren und Durchfluss verwerfen. Das Säulchen in ein frisches Eppi stecken und noch mal für 1min bei 13200rpm zentrifugieren um Reste von Ethanol vom PE Puffer zu entfernen. Das Säulchen wieder in ein frisches Reaktionsgefäß stecken und die DNA mit 70µl EB eluieren. DNA bei Nichtverwendung bei $\leq -15^{\circ}\text{C}$ aufbewahren.

3.9.4.3. Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung erfolgt mit dem QIAGEN QIAEX II Gel Extraction Kit. Die gewünschte Gelbande wird über UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die ungefähr 3-fache Menge des Gewichtes der Agarosebande Puffer QX1 (für eine Gelbande von 1 Spur $\sim 250\mu\text{l}$ QX1 und für eine Gelbande von 2 Spuren $\sim 400\mu\text{l}$ QX1) und 7,5µl bis 15µl QIAExII Suspension (7,5µl für etwa 2µg DNA verwenden) und für 10-12min bei 50°C im Thermomixer schütteln lassen. Falls die Lösung rosa wird, noch etwas von Puffer QX1 zugeben ($\sim 50\mu\text{l}$). Die Lösung für 1min bei 13200rpm abzentrifugieren und Überstand verwerfen. Das Pellet 1x mit Puffer QX1 und 2x mit je 500µl Puffer PE waschen. Dazwischen immer für 1min bei 13200rpm zentrifugieren. Das Pellet am Schluss so gut wie möglich von Resten an Puffer befreien und an der Luft trocknen lassen bis das Pellet weiß wird. Die DNA mit 25µl bis 45µl Puffer EB eluieren. Für die 1kb Fragmente wird für die Elution generell 45µl Puffer EB und für Klonierungsfragmente 30µl Puffer EB verwenden.

3.9.4.6. PCR Aufreinigung mittels QIAGEN PCR Purification Kit

Die gewünschte Menge PCR-Ansatz mit dem 5-fachen Volumen Puffer PB vermengen (z.B. 40µl PCR-Ansatz + 200µl PB) und in eine PCR Purification Säule überführen. Nach dem Zentrifugieren bei 13200rpm für 1min und Verwerfen des Durchflusses 2x mit je 500µl Puffer PE waschen. Dazwischen immer für 1min bei 13200rpm zentrifugieren. Das Säulchen in ein frisches Reaktionsgefäß stecken und für 1min bei 13200rpm zentrifugieren. Säulchen wieder in ein frisches Reaktionsgefäß geben und DNA mit 30µl bis 40µl (je nach Menge an PCR-Produkt) EB eluieren.

3.9.5. Klonierung der Disruptionskonstrukte

3.9.5.1. Restriktionsverdau von Vektor und Inserts

Bei der Wahl des Restriktionsenzym muss vor dem Primerdesign überprüft werden, ob im zu klonierenden Fragment eine natürlich vorkommende BamHI-Schnittstelle

vorhanden ist. Wenn ja, wird versucht, einen anderen Bereich für die Disruptionskonstrukte zu wählen, oder ein anderes Restriktionsenzym zu verwenden. Bei den verwendeten Genen war es bei keinem nötig, ein anderes Enzym zu verwenden.

2µg Vektor wird in einem 50µl Ansatz mit 1µl BamHI für ~4h bei 37°C inkubiert. Damit die so generierten Enden nicht bei der Ligation miteinander religieren können, wird der mit BamHI geschnittene Vektor für 1h bei 37°C mit 0,2µl CIAP behandelt. Um das Enzym zu inaktivieren, wird der Reaktionsansatz für 10min bei 80°C inkubiert. Anschließend wird der geschnittene und mit CIAP inkubierte Vektor auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Vektorbande wurde aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mittels QIAExII Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die DNA wurde in 50µl EB eluiert.

Für die zu klonierenden Inserts werden 15µl der gereinigten PCR Produkte in 30µl Ansätzen mit 1µl BamHI für mind 2h bei 37°C inkubiert. Die geschnittenen Disruptionsfragmente auf einem Agarosegel auftrennen und die DNAs aus den herausgeschnittenen Gelfragmenten mittels QIAExII Gel Extraction Kit mit 35µl EB herauseluiieren.

3.9.5.2. Ligation, Transformation und Isolation der Miniprep DNAs

Die Ligationsansätze werden in 20µl Volumen angesetzt. Dafür wird 0.5µl BamHI geschnittener und CIAP behandelte pJDC9 oder pAUL-A mit 2,5µl der mit BamHI geschnittenen Disruptionsfragmente mit 2µl 10x Ligationspuffer und 0.4µl T4DNA Ligase (5 Weiss Units/µl) und 14,6µl dH₂O für 1h bei 22°C inkubiert. Um die T4DNA Ligase zu inaktivieren, welches die Transformationseffizienz erheblich steigert, wird der Ligationsansatz für 10min bei 65°C inkubiert und anschließend bis zur Transformation auf Eis gestellt. Alle der Ligationsansätze wurde in jeweils 50µl chemisch kompetenter DH5α wie in Punkt 3.9.1.1 beschrieben transformiert. Die nach 1½ bis 2 Tagen gewachsenen Kolonien werden wie in Punkt 3.9.3.2. beschrieben mittels Kolonie-PCR überprüft, ob die gewünschten Inserts vorhanden sind. Für die Miniprep DNA Isolation werden 8ml LB-Erythromycin Medium (200µg Erythromycin/ml Medium) mit der entsprechenden Kolonie angeimpft und für 16 – 20h bei 37°C geschüttelt. Vor der DNA Isolierung wurden Glycerinstocks hergestellt. Dafür wurden je 750µl o/n Kultur mit je 250µl 60% Glycerin versetzt, gevortext und

bei $\leq -60^{\circ}\text{C}$ weggefroren. Die Endkonzentration an Glycerin beträgt 15%. Aus dem Rest der o/n Kultur wurde die Miniprep-DNA mittels QIAGEN Miniprep Kit isoliert.

3.9.6. Herstellung von *S. pneumoniae* TIGR4 Arbeitsstocks

10ml THB Medium wird mit 50 μl aus dem aufgetauten Glycerinstock angeimpft und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Wenn die OD_{600} bei ungefähr 0,6 liegt, die Kultur mit 10%Glycerin versetzten (z.B. 1.5ml 60%Glycerin + 7,5ml Kultur) und zu 250 μl aliquotieren. Die so hergestellten Arbeitsstock bei $\leq -60^{\circ}\text{C}$ wegfrieren.

3.9.6.1. Transformation in *S. pneumoniae* TIGR4

Die Transformation der 3kbp Deletionskassetten und der Disruptionskonstrukte erfolgt nach dem gleichen Protokoll.

100 μl Arbeitsstocks werden zu 4,9ml THB pipettiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Wenn die OD_{600} bei ungefähr 0,25 liegt, wird die Kultur zur Transformation eingesetzt.

Dafür werden 1-3 μl DNA mit 178 μl Kompetenzmedium kurz vor der Transformation vermengt und mit 20 μl *S. pneumoniae* TIGR4 (OD_{600} ungefähr 0.25) versetzt. Die Transformationsansätze werden für 3h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend werden 100 μl auf Blutagarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 2 Tage bei 3h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.9.7. Herstellung von *H. influenzae* Rd KW20 Arbeitsstocks

10ml THB Medium wird mit 50 μl aus dem aufgetauten Glycerinstock angeimpft und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Wenn die OD_{600} bei ungefähr 0.6 liegt, die Kultur mit 10%Glycerin versetzten (z.B. 1.5ml 60%Glycerin + 7,5ml Kultur) und zu 250 μl aliquotieren. Die so hergestellten Arbeitsstock bei $\leq -60^{\circ}\text{C}$ wegfrieren.

3.9.7.1. Transformation in *H. influenzae* Rd KW20

160 μl Arbeitsstocks *H. influenzae* Rd KW20 werden zu 4ml sBHI Medium pipettiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Wenn die OD_{600} bei ungefähr 0,2 liegt, wird die Kultur zur Transformation eingesetzt.

Dafür werden 1-3 μl DNA (ungereinigte PCR-Produkte) mit ad 180 μl sBHI Medium kurz vor der Transformation vermengt und mit 20 μl *H. influenzae* Rd KW20 (OD_{600}

ungefähr 0,2) versetzt. Die Transformationsansätze werden für 3h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend werden 100µl auf sBHI-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 2 Tage bei 3h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.9.8. Knock-outs in *S. aureus* RN4220

Zirka die Hälfte einer Kolonie von pAUL-DUP oder -DIS Konstrukten oder pAUL-A in *S. aureus* RN4220 in 5ml BHI-Erythromycinmedium bei 30°C und schütteln inkubieren. Nach 16-20h werden die Kulturen mit 42°C warmen BHI-Erm Medium auf OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt. Die Kulturen bei 42°C bis zu einer OD von ~7 weiterwachsen lassen. Die Kulturen mit 42°C warmen BHI-Erm Medium auf 0,1 und 0,01 runterverdünnen. Dieser Schritt wird in 1,5ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Diese werden soweit wie möglich ständig auf 42°C temperiert (Thermomixer). Je 100µl dieser verdünnten Kulturen werden auf 42°C vorgewärmte BHI-Erm Platten ausplattiert und bei 42°C für 16-20h inkubiert.

4. Resultate

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, geeignete Methoden zur Bestimmung der Essentialität eines Genes zu finden. Ein weiteres Ziel war es, essentielle Gene in *S.pneumoniae*, *S.aureus* und *H.influenza* zu identifizieren. Der erste Screen im gram-positiven Bereich wurde in *S.pneumoniae* durchgeführt. Die dabei für das Überleben des Bakteriums gefundenen Gene wurden nach bestimmten Kriterien für Essentialitätsstudien in *S.aureus* und *H.influenza* herangezogen.

4.1. Isolierung der genomischen DNA

Für die Amplifikation der einzelnen Genabschnitte und Flanken wird als Template von *S. pneumoniae* TIGR4 für die PCR die chromosomale DNA benötigt. Diese wurde mit dem wizard genomic Kit (Fa. Promega) wie in Punkt 3.9.4.1 beschrieben isoliert. Um die Quantität und die Qualität der isolierten DNA zu bestimmen, werden photometrische Messungen der Absorption bei 260nm und 280nm durchgeführt. Die Reinheit der Nukleinsäuren lässt sich aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ abschätzen. Dieser Wert sollte bei 1,8 bis 2,1 liegen (35), liegen diese unterhalb, weist das auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

DNA	Verd	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	ng/μl
<i>S. pneumoniae</i>	1:50	0,4227	0,2200	1,92	1056,75

Tabelle 8: Messung der OD genomischer DNA

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Die Konzentration ist direkt proportional zur gemessenen Absorption und kann mit wie folgt berechnet werden:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

In dieser Formel steht A für die Absorption (früher Extinktion), ϵ für den Proportionalitätsfaktor in l/molcm, der nur von der Wellenlänge abhängig ist und bei den für die DNA-Messung verwendeten λ gleich mit 1 gesetzt werden kann, c für die Konzentration des gemessenen Stoffes in mol/l und d für die Schichtdicke der Küvette in cm, die in meinen Fällen 1cm beträgt. Für eine OD₂₆₀ von 1 wurde für doppelsträngige DNA die Konzentration von 50 μg/ml zurunde gelegt (35).

4.2.Etablierung einer knock-out Methode in *S.pneumoniae*

In der Literatur sind hauptsächlich zwei Methoden zur Feststellung der Essentialität von *S. pneumoniae* Genen beschrieben. Bei der ersten handelt es sich um die Plasmid Insertion Mutageneses, bei der die in einen Suizidvektor klonierten

Genfragmente durch einfache homologe Rekombination die Zielgene zerstören. Bei der anderen Methode handelt es sich um die Allelic Replacement Mutagenese, bei der lineare Fragmente verwendet werden. Durch doppelte homologe Rekombination wird das Zielgen durch eine Antibiotikaresistenzkassette ausgetauscht. Im ersten Schritt werden bei 24 verschiedenen Genen mit beiden Methoden auf Essentialität überprüft. Anhand der Ergebnisse und der Praktikabilität der Vorbereitungsarbeiten vor dem eigentlichen Experimenten auf Essentialitätsüberprüfung wird entschieden, mit welcher Methode anschließend eine Vielzahl an Genen überprüft wird. Bei den Resultaten der einzelnen Zwischenschritte werden nur auszugsweise Ergebnisse abgebildet, da diese repräsentativ für alle untersuchten Gene sind und ansonsten den Umfang dieser Diplomarbeit sprengen würde.

4.2.1. Herstellung der Suizidvektoren mit entsprechenden Fragmenten

Für die Gendisruptionsmethode müssen interne Fragmente des zu untersuchenden Genes in den Suizidvektor pJDC9 kloniert werden. Die zu klonierenden Fragmente werden mittels PCR amplifiziert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation werden je 5µl der einzelnen PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen. Wie in Abb. 12 ersichtlich ist, funktionierte die PCR für die relativ kleinen Fragmente sehr gut, da im Bereich der zu erwartenden Größe diskrete Banden vorhanden sind und zudem keine zusätzlichen Banden auftreten.

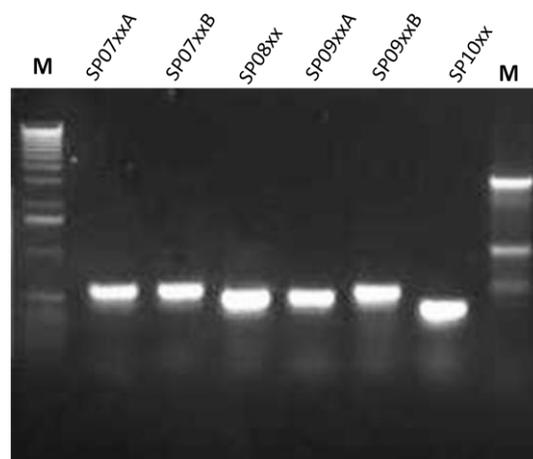


Abb.12: Agarosegel mit je 5µl der mittels PCR amplifizierten Disruptionsfragmente

Je 40µl eines jeden PCR-Ansatzes wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und die DNA in je 40µl EB eluiert. Jeweils 15µl der gereinigten PCR's wurden in den Restriktionsverdau eingesetzt. Die mit BamHI geschnittenen PCR-Fragmente wurden auf je 2 Spuren ein Agarosegel aufgetragen. (siehe Abb. 13).

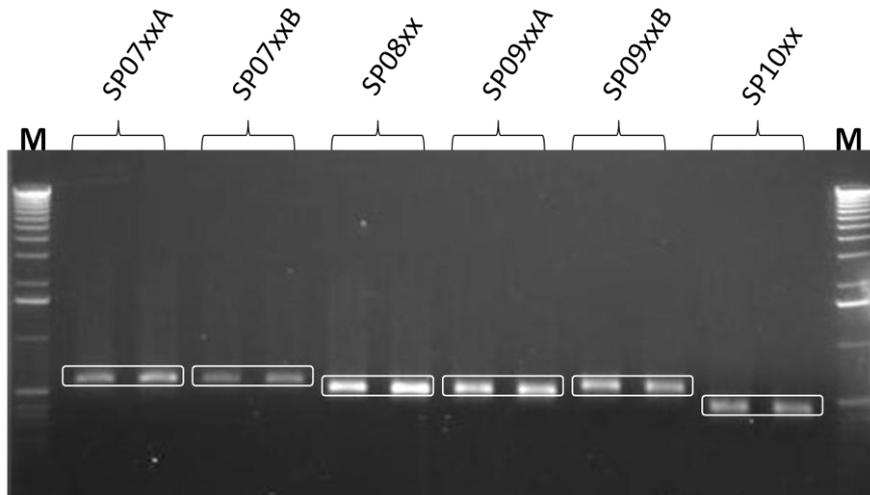


Abb.13: Agarosegel mit geschnittenen Disruptionsfragmente

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die entsprechende Band aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNA's wurden in jeweils 35µl EB eluiert.

Der Suizidvektor pJDC9 wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau mit BamHI mit CIAP behandelt und auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb.14).

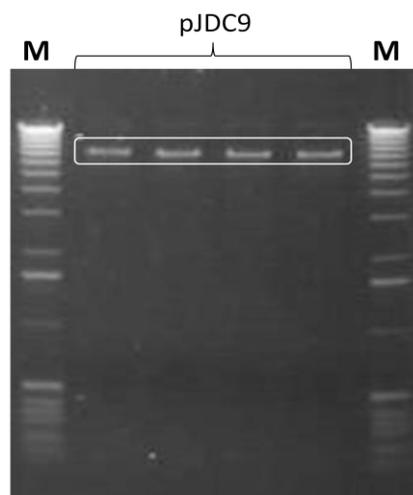


Abb.14: Agarosegel mit BamHI geschnittenen und CIAP behandeltem pJDC9

Die markierten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNAs mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNAs wurden in 50µl EB eluiert.

Die mit BamHI geschnittenen und aufgereinigten Disruptionskonstrukte wurden in den mit BamHI geschnittenen, mit CIAP behandelten und aufgereinigten pJDC9

ligiert und in chemisch kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C waren auf den LB-Erythromycin Platten zwischen 1 und 150 Kolonien gewachsen. Mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, ob in den Kolonien der pJDC9 mit entsprechendem Insert enthalten war. Abb. 15 ist repräsentativ für alle Konstrukte.

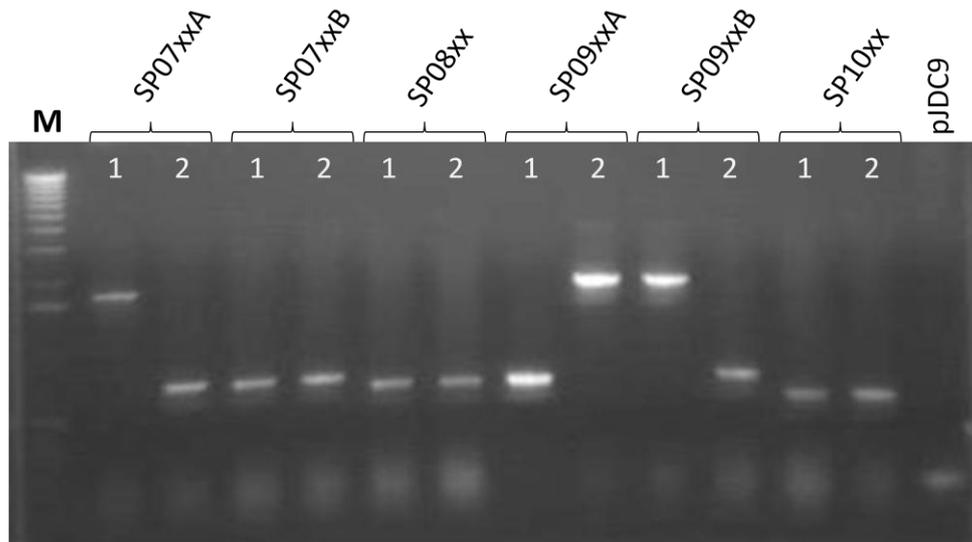


Abb.15: Agarosegele mit den Kolonie-PCRs
 SP07xxA #1, SP09xxA #2 und SP09xxB #1 enthalten Duplikate als Insert
 pJDC9 als „Leerkontrolle“

Kolonien mit dem entsprechendem richtigen Konstrukt wurden in LB-Erythromycin Medium angeimpft und aus den Übernachtskulturen nach erfolgter Herstellung von Glycerinkulturen zwecks Stammhaltung die Miniprep DNA mittels QIAquick Miniprep Kit isoliert.

4.2.2. Herstellung der linearen 3kbp Konstrukte für die ARM

Für die Gendelektionsmethode müssen die 5' und die 3' Flanke der entsprechenden Gene und die Kanamycin-Kassette mittels PCR fusioniert werden. Wie in Abb. 16 ersichtlich, haben alle Banden die gewünschte Größe von ca 1kbp.

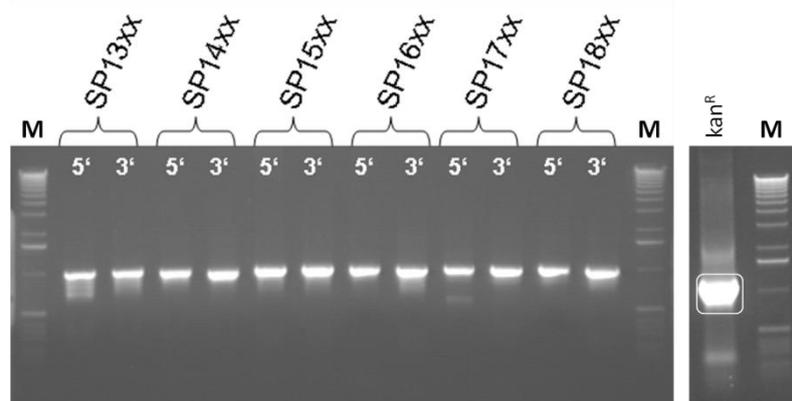


Abb.16: Agarosegel mit den amplifizierten 1kbp Flanken und der Kanamycin-Kassette

Die einzelnen Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNAs mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNAs wurden in 45µl EB (1kb Fragmente) bzw. 60µl EB (Kanamycin-Kassette) eluiert.

Mit den 5'- und den 3'- Flanken und der Kanamycin-Kassette wurden die PCR's für die 3kbp Deletionskassetten angesetzt. Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden je 5µl der PCR-Ansätze zwecks Überprüfung der PCRs auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb.12). Die Fusions-PCR hat dann gut funktioniert, wenn alle Edukte zu einem 3 kbp großem Fragment verschmolzen sind (siehe Abb. 17).

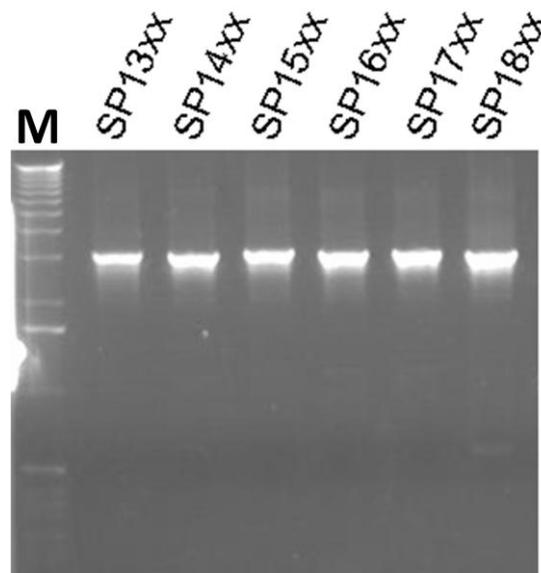


Abb.17: Agarosegel mit den amplifizierten 3kbp Deletionskonstrukten

4.2.3. Transformation der Konstrukte und Generierung der Knock-outs

Nach Transformation der oben beschriebenen Konstrukte in *S. pneumoniae* wurden die Essentialität der jeweiligen Gene auf mit Erythromycin beziehungsweise Kanamycin versetzten Platten geprüft.

Die Essentialität eines Gens wurde über die Anzahl der Kolonien von 3 unabhängigen Experimenten bestimmt (siehe Abb.18).

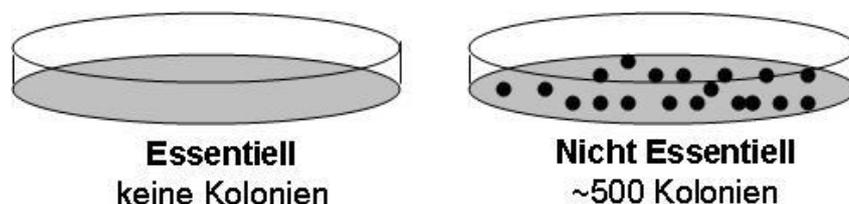


Abb.18: Kolonien nach 2 Tagen Inkubation

Bei den Disruptionskonstrukten wurde dieselbe Miniprep-DNA 3x in *S. pneumoniae* transformiert und bei den Deletionskonstrukten wurden die Ansätze ab den PCRs für die 1kb Flanken 3x wiederholt (siehe Tabelle 9).

Gen	div	Del 1	Del 2	Del 3	Dis 1	Dis 2	Dis 3
SP01xx		+++	+++	+++	-	-	-
SP02xx		+++	+++	++	-	-	-
SP03xx		(+)	(+++)	(++)	-	-	+
SP04xx		++	++	++	-	-	-
SP05xx		((++))	((++))	((++))	-	-	-
SP06xx		+++	++	+++	+	+	+
SP07xx	A	+	-	-	-	-	-
SP07xx	B				-	-	-
SP08xx		+++	++	+++	-	-	-
SP09xx	A	+++	++	++	+	+	+
SP09xx	B				+	+	+
SP10xx		((++))	((++))	((++))	+	+	-
SP11xx		+++	++	+++	+	+	+
SP12xx		++	++	++	+	-	-
SP13xx		+++	++	+++	+	-	-
SP14xx		-	-	-	-	-	-
SP15xx		-	-	-	-	-	-
SP16xx		++	(+++)	+++	+	+	+
SP17xx		-	-	-	-	-	-
SP18xx		++	+++	+++	+	+	+
SP19xx		++	(++)	(++)	-	-	-
SP20xx		++	++	+++	-	-	+
SP21xx		++	++	++	+	-	+
SP22xx		++	+++	+++	+	+	+
SP23xx		+++	+++	+++	-	-	-
SP24xx		-	-	-	-	-	-

Tabelle 9: Ergebnisse der knock-out Experimente

+++ : gleich viele Kolonien wie bei der Kontrolle (ungefähr 500 Kolonien)

++ : deutlich weniger Kolonien wie Kontrollen (<200 Kolonien)

+ : 1-10 Kolonien

- : keine Kolonien

Klammern bedeuten, dass die Kolonien deutlich kleiner als normalerweise waren

Bei der Bestimmung der Essentialität mit der Gendeletionsmethode konnten 5 essentielle Gene festgestellt werden. Wenn man die Gendisruptionsmethode zur Identifikation essentieller Gene verwendet, würden 12 Gene als essentiell eingestuft werden und bei weiteren 4 Genen (1+, 2-) müssten zusätzliche Experimente durchgeführt werden.

4.2.4. Anwendung der ARM auf weitere *S. pneumoniae* Gene

Wie bei dem obigen Vergleich der IDM und ARM gezeigt werden konnte, sind die Ergebnisse der ARM aussagekräftiger. Der Grund ist, dass die Transformationseffizienz bei dieser Methode bei weitem höher ist als mit der IDM und falsch negative aufgrund der Effizienz ausgeschlossen werden können.

Es wurden 196 zusätzliche *S. pneumoniae* Gene für die Allelic Replacement Mutagenesis ausgewählt. Bei fast allen Genen war die Amplifikation der schlussendlich 3kbp Fragmente möglich. Bei einem Gen (SP1xx5) war es trotz mehrmaliger Versuche nicht möglich, die 5' Flanke zu amplifizieren. Es wurden außerdem auch neue Primer dafür designed, welche aber auch nicht die gewünschten Ergebnisse brachten. Bei SP0xx3 und SP1xx4 konnten keine 3kbp Deletionskassetten amplifiziert werden obwohl die 5`und 3`Flanken mengenmäßig gute Produkte lieferten. Es wurden auch hier mehrere Ansätze mit verschiedenen Mengen an Flanken und Kanamycinkassette für die PCR ausprobiert, welche alle keine gewünschten Fusionsprodukte lieferten (Resultate nicht gezeigt).

Es wurden die 3kbp Fragmente aller untersuchten *S. pneumoniae* Gene zweimal von der Amplifikation der 1kbp Fragmente beginnend hergestellt und insgesamt dreimal (das erste 3kbp Fragment zweimal und das zweite 3kbp Fragment einmal) *S. pneumoniae* Genen konnten 57 als essentiell eingestuft werden.

4.3. Etablierung einer knock-out Methode in *S. aureus*

4.3.1. Gendisruption

Als geeignete Methode zur Bestimmung der Essentialität für *S. pneumoniae* orthologe Gene in *S. aureus* wurde die Disruption mittels Temperaturshift ausgewählt. Um Polaritätseffekte durch die Integration des Plasmids feststellen zu können, werden Duplikations und Disruptionskonstrukte hergestellt. Als Shuttlevektor soll pAUL-A (siehe Abb. 19) (21) dienen.

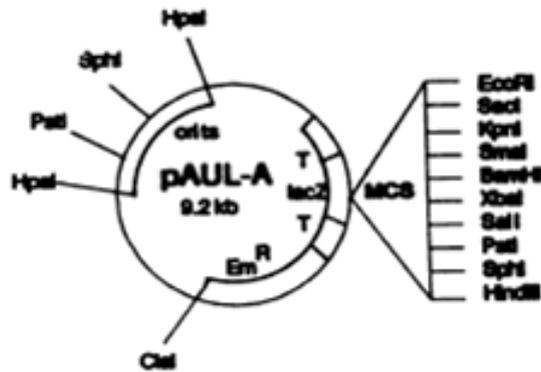


Abb. 19: Map des Vektors pAUL-A
 Übernommen aus Chakraborty *et al* (1992)

Dieser enthält einen temperatur-sensitiven ori von dem Plasmid pE194. Villafane *et al* (36) beschreibt eine Vielzahl von Mutationen in der Replikationsregion von pE194, die einerseits die copy-number (Mutationen in der cop-Region) und andererseits einen Einfluss auf die Temperatursensitivität (Mutationen des repF Genes) haben. Wildtyp pE194 kann nicht oberhalb von 43°C und die temperatursensitive Variante pE194ts kann nicht bei Temperaturen über 37°C replizieren. In pE194ts sind zwei Transitionsmutationen an den Positionen 1235 und 1431 vorhanden. Dieser mutierte ori wurde in pJDC9 kloniert. Dadurch wurde der temperatursensitive Shuttlevektor pAUL-A generiert. Zur Überprüfung ob dieser wirklich den mutanten ori enthält, wurde dieser Bereich sequenziert.

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
1 pE194 ori.txt	GGCAGCTGC	CTATCTATGA	CTAARTTTPG	TTAAGTGTAT	TAGCACCGTT	ATTATATCAT	GAGCGAANT	GTARTAAAG	AACTGAAA	CAGAAAAAT
2	---									
3	---									
4 pAUL-A-4024	---									
5	---									
6 pAUL-A-4023	---									
7	---									
8 pAUL-A-4022	GGCAGCTGC	CTATCTATGA	CTAARTTTPG	TTAAGTGTAT	TAGCACCGTT	ATTATATCAT	GAGCGAANT	GTARTAAAG	AACTGAAA	CAGAAAAAT
9	---									
10 pAUL-A-4025	---									

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
1 pE194 ori.txt	TCAGAGGAC	GTARTGGAC	ATTGTGTTA	TATCCAGAT	CAGCAAGGC	CGAGTGTTA	GAGTATTAA	AAGAGTACA	CATTCATTT	GTAGTGTCT
2	---									
3	---									
4 pAUL-A-4024	---									
5	---									
6 pAUL-A-4023	---									
7	---									
8 pAUL-A-4022	TCAGAGGAC	GTARTGGAC	ATTGTGTTA	TATCCAGAT	CAGCAAGGC	CGAGTGTTA	GAGTATTAA	AAGAGTACA	CATTCATTT	GTAGTGTCT
9	---									
10 pAUL-A-4025	---									

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
1 pE194 ori.txt	CATTCATTT	TAGTGTCT	TGGGGTAA	AAATCTAAT	TCTAGTGTCT	TAGTGTGTA	TGGGGTAA	AAATCTAAT	TCTAGTGTCT	TAGTGTGTA
2	---									
3	---									
4 pAUL-A-4024	---									
5	---									
6 pAUL-A-4023	---									
7	---									
8 pAUL-A-4022	CATTCATTT	TAGTGTCT	TGGGGTAA	AAATCTAAT	TCTAGTGTCT	TAGTGTGTA	TGGGGTAA	AAATCTAAT	TCTAGTGTCT	TAGTGTGTA
9	---									
10 pAUL-A-4025	---									

Abb. 20: Sequenzierung des temperatursensitiven ori
 Mutationen an Position 1235 und 1431 sind mit * markiert

Wie in der Abb. 20 ersichtlich ist, sind die beiden Mutationen an der entsprechenden Stellen vorhanden.

Zur Überprüfung, ob es bei dem Plasmid tatsächlich um pAUL-A handelt, wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen Restriktionsverdaues angesetzt. Dabei wurde die Ausgangs DNA und die aus 2 verschiedenen Kolonien nach der Transformation aus *E. coli* DH5 α isolierte DNA verwendet.

Die ausgewählten Enzyme wurden so gewählt, dass zwischen pJDC9 und pAUL-A unterschieden werden konnte. In der nachfolgenden Abb. 21 ist das Restriktionsmuster zu sehen.

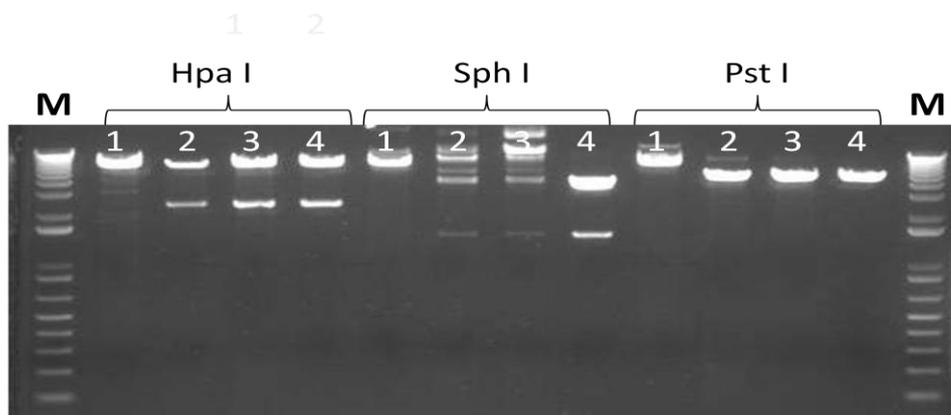


Abb. 21: Restriktionsanalyse pAUL-A
 1: pJDC9
 2 + 3: DNA von pAUL-A aus 2 unterschiedliche Kolonien
 4: pAUL-A (Laborstock)

Hpa I:

in die Hpa I Schnittstelle von pJDC9 wurde der temperatursensitive ori (ori^{ts}) inkloniert

pJDC9: linearisiert → ok

pAUL-A: ein ca 2,2kb grosses Fragment (entspricht dem kompletten ori^{ts}) wird herausgeschnitten → ok

Sph I:

Kommt einmal in der multiple cloning site und einmal im ori^{ts} vor

pJDC9: linearisiert → ok

pAUL-A: ein ca1,5 kb grosses Fragment wird herausgeschnitten → ok

Pst I:

Kommt einmal in der multiple cloning site und einmal im ori^{ts} vor

pJDC9: linearisiert → ok

pAUL-A: zwei etwa gleich grosse Fragmente entstehen → ok

4.3.2. verwendete Gene zur Etablierung in *S. aureus*

Zur Etablierung der Methode wurden folgende Gene ausgewählt:

ProteinA (SAc0095).

Bei diesem Protein handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das an Fc-Region der Immunglobuline durch Interaktion mit der schweren Kette bindet. Das Bakterium kann sich somit gegen Antikörper im Körper schützen. Es handelt sich um einen Virulenzfaktor (37).

femX (SAc2253)

femX spielt eine entscheidende Rolle in der Zellwandsynthese bei *S. aureus* und ist essentiell (38).

ftsZ (SAc1199)

ftsZ ist strukturell ähnlich dem eukaryontischen Tubulin und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und es wurde in mehreren Arbeiten dessen Essentialität bewiesen werden (39)

Virulenzfaktor (SAc0723)

Virulenzfaktoren sind nicht essentiell.

Die Disruptionsexperimente wurden in dem restriktionsdefizienten *S. aureus* RN4220 durchgeführt, welcher bisher nicht sequenziert ist. Für das Primerdesign der entsprechenden Gene wird die Sequenz des *S. aureus* COL herangezogen. Als Template für die PCR wird eine aufgekochte Bakteriensuspension *S. aureus* COL verwendet. Da es sich bei dem Stamm COL um einen MRSA Stamm handelt, wurde angenommen, dass dieser Stamm nur zusätzliche Gene oder eventuell Variationen von Genen in Bezug auf den Stamm RN4220 besitzt und somit eine Amplifizierung der gewünschten Gensegmente kein Problem darstellen sollten.

Aus diesem Grund soll mittels PCR das Vorhandensein der Gene in *S. aureus* RN4220 bestätigt werden. Hierfür werden mit den jeweiligen Duplikationsprimern PCR's direkt von einer *S. aureus* RN4220 Kolonie durchgeführt. Wie in Abb. 22 zu

sehen ist, konnte mit allen Primerpaaren ein Produkt mit der entsprechenden Größe amplifiziert werden.

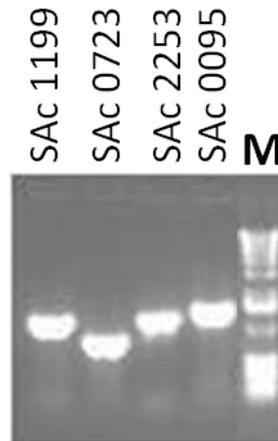


Abb. 22: PCR's zur Überprüfung ob die untersuchten Gene in *S. aureus* RN4220 vorhanden sind

Auch mit allen weiteren untersuchten Genen wurde solch eine Kontrolle durchgeführt. Die PCR lieferte bei allen ein Produkt, mit der entsprechenden Größe (Resultate nicht gezeigt).

Jeweils der gesamte ORF und ein internes Fragment des jeweiligen zu untersuchenden Genes wird in den Shuttle-Vektor pAUL-A kloniert. Nach erfolgter Transformation in *S. aureus* RN4220 wird durch einen Temperaturshift die Integration der Konstrukte erzwungen.

4.3.3. Herstellung der Duplikations- und Disruptionskonstrukte

Für die Gendisruptionsmethode der gesamte ORF und ein internes Fragment des jeweiligen zu untersuchenden Genes wird in den Shuttle-Vektor pAUL-A kloniert werden. Die zu klonierenden Fragmente werden mittels PCR amplifiziert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation werden je 5µl der einzelnen PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abb. 23 ist repräsentativ für alle Gene gut zu erkennen, dass die PCR sehr gut funktioniert, da im Bereich der zu erwartenden Größe entsprechende Banden vorhanden sind und zudem keine zusätzlichen Banden auftreten.

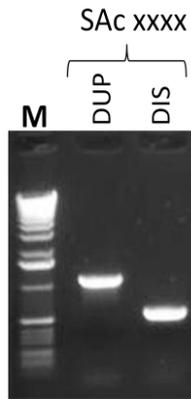


Abb.23: Agarosegel mit je 5µl der mittel PCR amplifizierten Disruptionsfragmente

Je 40µl eines jeden PCR-Ansatzes wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und die DNA in je 40µl EB eluiert. Jeweils 15µl der gereinigten PCR's wurden in den Restriktionsverdau eingesetzt. Die mit BamHI oder KpnI geschnittenen PCR-Fragmente wurden auf je 2 Spuren ein Agarosegel aufgetragen. (siehe Abb. 24).

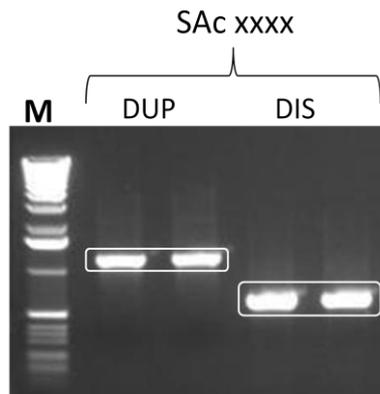


Abb.24: Agarosegel mit geschnittenen Disruptionsfragmente

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die entsprechende Band aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNA's wurden in jeweils 35µl EB eluiert.

Der Suizidvektor pAUL-A wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau mit BamHI bzw KpnI mit CIAP behandelt und auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb. 25).

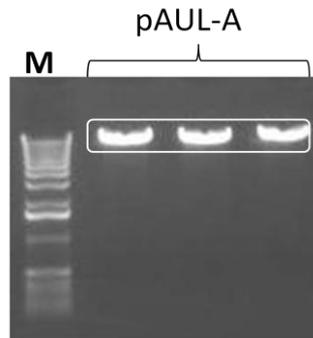


Abb.25: Agarosegel mit BamHI geschnittenen und CIAP behandeltem pAUL-A

Die markierten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNAs mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNAs wurden in 50µl EB eluiert.

Die mit BamHI geschnittenen und aufgereinigten Disruptionskonstrukte wurden in den mit BamHI geschnittenen, mit CIAP behandelten und aufgereinigten pJDC9 ligiert und in chemisch kompetente *E.coli* DH5α transformiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C waren auf den LB-Erythromycin Platten zwischen 10 und 150 Kolonien gewachsen. Mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, ob in den Kolonien der pJDC9 mit entsprechendem Insert enthalten war. Abb. 26 ist repräsentativ.

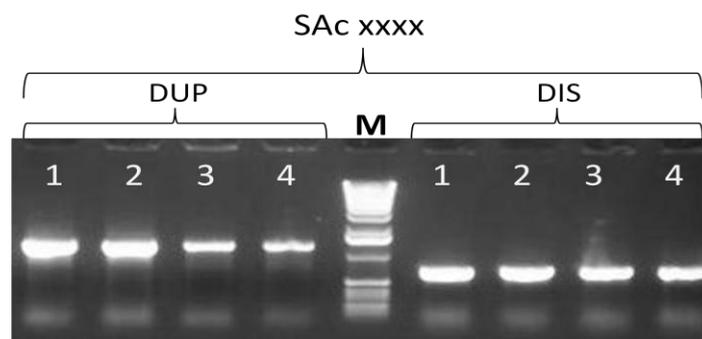


Abb.26: Agarosegele mit den Kolonie-PCRs

Kolonien mit dem entsprechendem richtigen Konstrukt wurden in LB-Erythromycin Medium angeimpft und aus den Übernachtskulturen nach erfolgter Herstellung von Glycerinkulturen für die Stammhaltung die Miniprep DNA mittels QIAquick Miniprep Kit isoliert.

4.3.4. Optimierung der Elektroporation in *S. aureus* RN4220

Die elektrokompenten *S. aureus* RN4220 wurden mit verschiedenen Bedingungen bezüglich Inkubationszeit und Inkubationsdauer-temperatur der DNA mit den elektrokompenten Zellen und der Elektroporationbedingungen ausprobiert. Die

Resultate dieser Versuche wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Als DNA wurden ca 100ng pAUL-A verwendet.

Inkubation vor Elektroporation	Elektrischer Impuls	Impulsdauer	erhaltene Kolonien
5 min Eis	1,8 kV	5,6 msec	0
5 min Eis	2,3 kV	5,4 msec	0
10 min RT	1,8 kV	5,6 msec	0
10 min RT	2,3 kV	5,4 msec	100

Tabelle 10: Zusammenfassung Elektroporation

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, wurden folgende Bedingungen ausgewählt:

- Inkubation der DNA mit den elektrokompetenten Zellen bei RT für 10min
- 2300V

Mit diesen Bedingungen wurden alle Elektroporationen durchgeführt. Zur Überprüfung ob in den erhaltenen Kolonien tatsächlich das entsprechende Konstrukt enthalten war, wurden Kolonie-PCRs mit den M13 forward und reverse Primern durchgeführt. Abb. 27 zeigt das PCR-Produkt mit den M13 forward und reverse Primern von pAUL-A in *S. aureus* RN4220 .

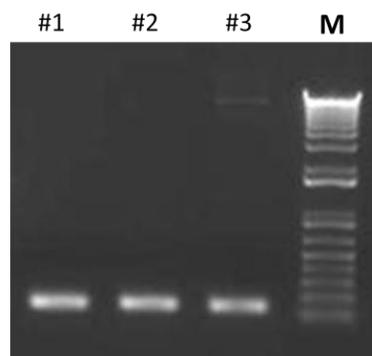


Abb.27: Agarosegele mit den Kolonie-PCRs

Die genspezifischen PCR's wurden mit dem Forward-Primer für das jeweilige Disruptionskonstrukt und einmal mit dem M13 forward und einmal mit dem M13 reverse Primer durchgeführt, da die Orientierung im pAUL-A durch die Klonierungsstrategie nicht bekannt ist. Zusätzlich wurde auch mit beiden M13 Primern eine PCR angesetzt, um das Vorhandensein des Inserts zu bestätigen (Abb. 28).

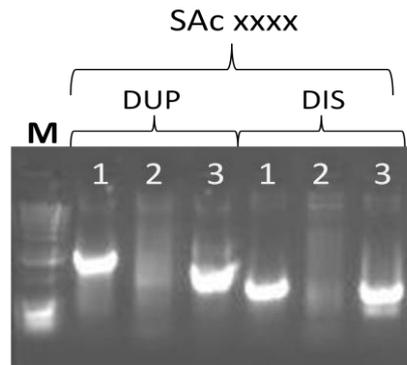


Abb.28: Agarosegele mit den Kolonie-PCRs

Die Überprüfung der Transformation mittels PCR funktioniert sehr gut für die Konstrukte mit Inserts bis etwa 2000bp. Bei größeren PCR Produkten ist die Kapazität der Taq Polymerase oftmals ausgeschöpft und es werden keine ausreichenden Produkte geliefert.

4.3.5. Optimierung der Disruption/Duplikation für Essentialitätsstudien in *S. aureus*

4.3.5.1. Essentialitätsstudien mit Flüssigkulturen

Es wurde im ersten Versuch ausprobiert, ob es möglich war, die Integration der Disruptionskonstrukte und Duplikationskonstrukte durch Kultivierung auf Agarplatten und einen Temperaturshift zu erzwingen. Kolonien von dem mit den Disruptionskonstrukten transformierten *S. aureus* RN4220 wurden auf BHI-Erm Platten ausgestrichen und über Nacht bei 42°C inkubiert. Parallel dazu wurde eine Replikplatte bei 30°C inkubiert. Erwartet wurde, dass das Wachstum auf den Platten, die bei 42°C inkubiert wurden, reduziert wäre. Durch die erhöhte Temperatur war es den Plasmiden nicht mehr möglich zu replizieren und sie müssten in das Chromosom integrieren. Es konnte aber kein Unterschied im Wachstum bei beiden Temperaturen beobachtet werden. Die Bakterien wuchsen bei 42°C sogar deutlich besser.

Im nächsten Experiment erfolgte der Temperaturshift während der Kultivierung in Flüssigmedium. Dazu wurden dreimal je 5ml BHI-Erm Medium mit je einer Kolonie von *S. aureus* RN4220 mit dem entsprechenden Konstrukten von SAc1199 (*ftsZ*) und SAc0723 (virulence factor) und als Kontrolle pAUL-A inokuliert und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 kultiviert. Die Kulturen wurden dann anschließend 1:100 mit frischem BHI-Erm Medium verdünnt und bei 42°C unter

Schütteln weiterkultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 wurden die Kulturen wieder 1:100 mit obigen Medium verdünnt und bei 42°C weiterkultiviert. Dies wurde mehrmals durchgeführt. Wie in Abb. 29 bis 31 zu sehen ist, kann man keine Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen dem essentiellen SAc1199 und dem nicht essentiellen SAc0723 und dem leeren Vektor pAUL-A erkennen.

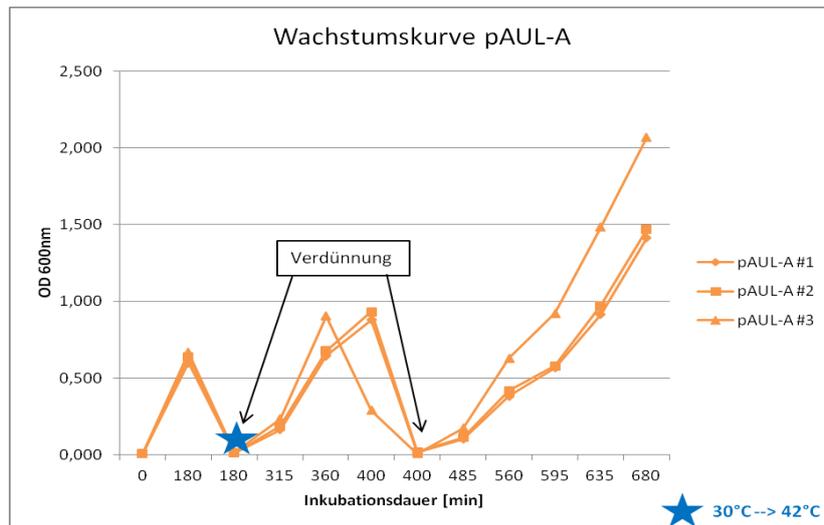


Abb. 29: Wachstumsverhalten von pAUL-A in *S. aureus* RN4220

Kulturen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.7 kultiviert und anschließend 1:100 mit 42°C warmen Medium verdünnt und bei 42°C weiter bis zu eine OD₆₀₀ von 0.6 wachsen lassen. Kulturen wurden noch einmal wie vorhin beschrieben verdünnt und weiterkultiviert.

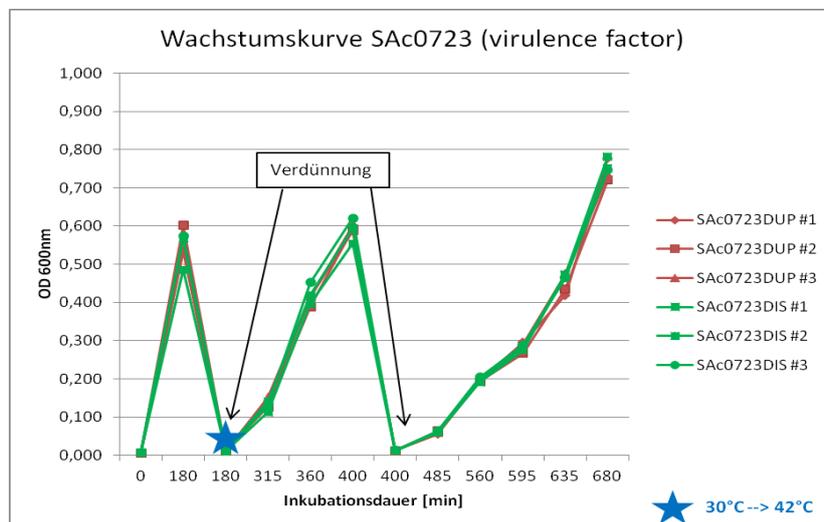


Abb. 30: Wachstumsverhalten von SAc0723 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220

Kulturen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.7 kultiviert und anschließend 1:100 mit 42°C warmen Medium verdünnt und bei 42°C weiter bis zu eine OD₆₀₀ von 0.6 wachsen lassen. Kulturen wurden noch einmal wie vorhin beschrieben verdünnt und weiterkultiviert.

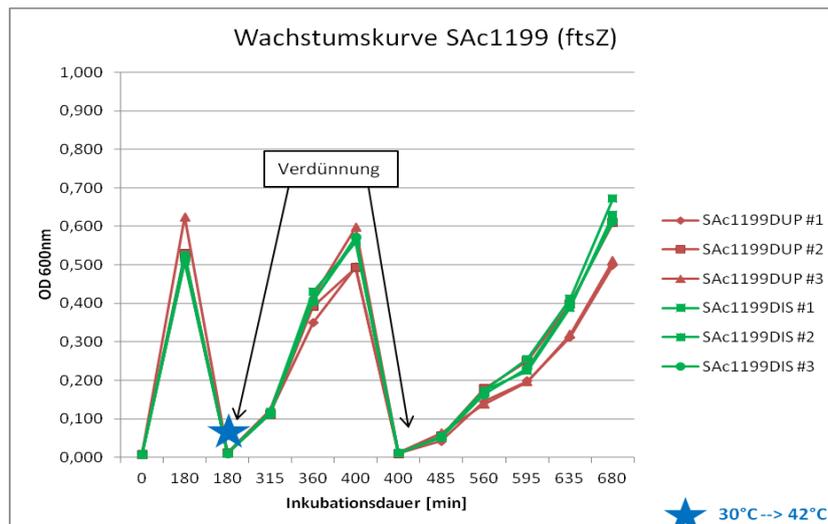


Abb. 31: Wachstumsverhalten von SAc1199 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220

Kulturen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.7 kultiviert und anschließend 1:100 mit 42°C warmen Medium verdünnt und bei 42°C weiter bis zu eine OD₆₀₀ von 0.6 wachsen lassen. Kulturen wurden noch einmal wie vorhin beschrieben verdünnt und weiterkultiviert.

Im nächsten Versuch wurden 5ml BHI-Erm Medium mit einer Kolonie von *S. aureus* RN4220 mit den entsprechenden Konstrukten von Sac0095 (prtA), SAc0723 (virulence factor), SAc1199 (ftsZ) und SAc2253 (femX) inokuliert und bei 30°C unter Schütteln für etwa 9 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 8 kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend mit 42°C warmen BHI-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt und über Nacht bei 42°C unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen so mit 42°C warmen BHI-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt, dass man jeweils 5ml Kultur mit entsprechender OD₆₀₀ erhält. Die Kulturen wurden bei 42°C weitergeschüttelt und bei verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ gemessen.

Wie in Abb. 32 bis 35 gut zu sehen ist, war zwischen den nicht essentiellen Genen Sac0095 (prtA) und SAc0723 (virulence factor) und den essentiellen Genen SAc1199 (ftsZ) und SAc2253 (femX) ein eindeutiger Unterschied im Wachstumsverhalten zu erkennen.

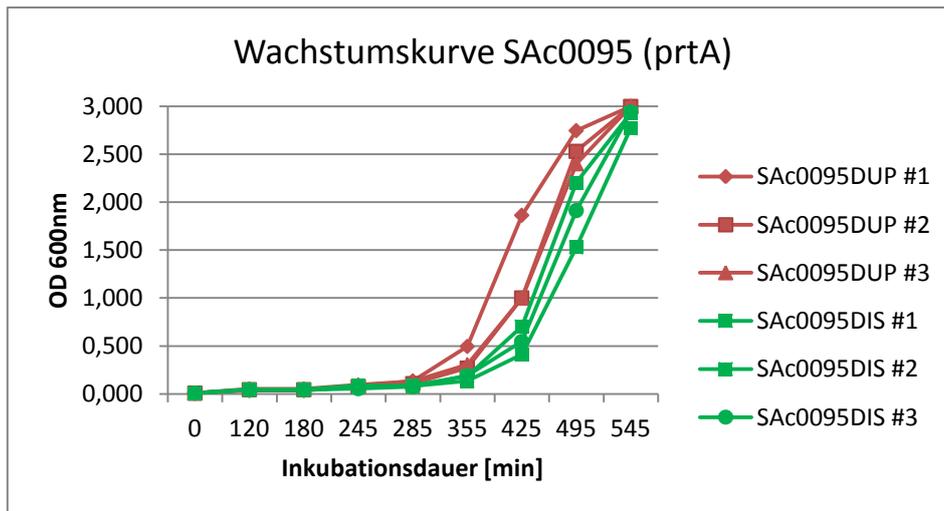


Abb. 32: Wachstumsverhalten von SAc0095 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220 Kulturen über Nacht bei 42°C kultivieren und anschließend mit 42°C warmen Medium eine OD₆₀₀ von 0.01 verdünnen und bei 42°C weiter wachsen lassen.

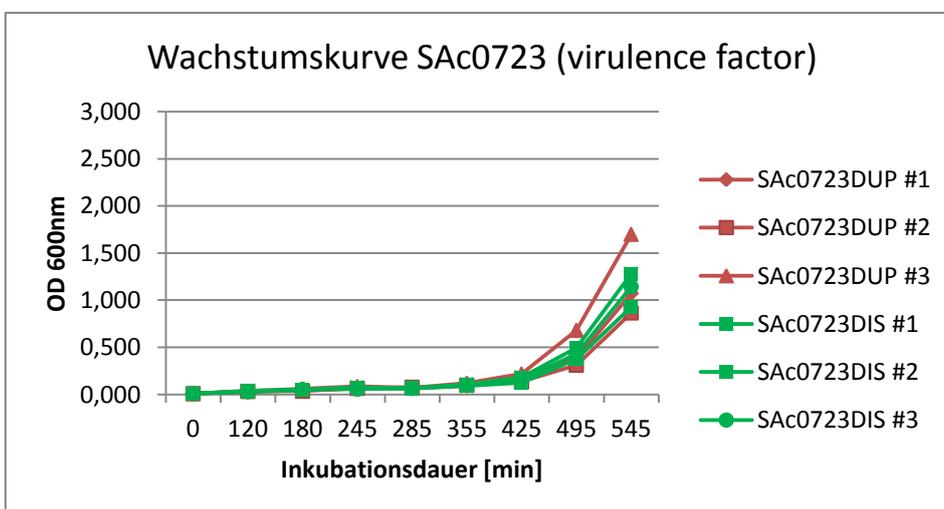


Abb. 33: Wachstumsverhalten von SAc0723 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220 Kulturen über Nacht bei 42°C kultivieren und anschließend mit 42°C warmen Medium eine OD₆₀₀ von 0.01 verdünnen und bei 42°C weiter wachsen lassen.

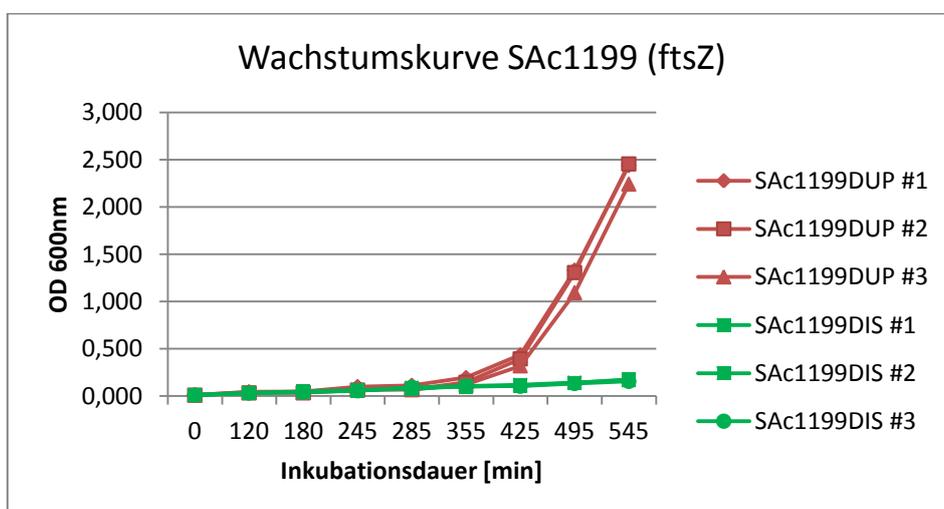


Abb. 34: Wachstumsverhalten von SAc1199 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220 Kulturen über Nacht bei 42°C kultivieren und anschließend mit 42°C warmen Medium eine OD₆₀₀ von 0.01 verdünnen und bei 42°C weiter wachsen lassen.

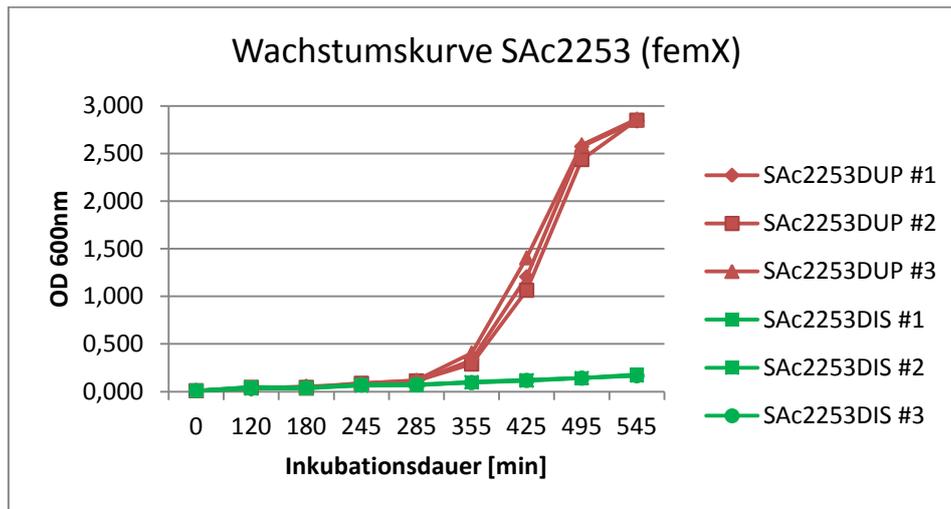


Abb. 35: Wachstumsverhalten von SAc2253 in pAUL-A in *S. aureus* RN4220 Kulturen über Nacht bei 42°C kultivieren und anschließend mit 42°C warmen Medium eine OD₆₀₀ von 0.01 verdünnen und bei 42°C weiter wachsen lassen.

Mit dieser Methode wurden weiter *S. aureus* Gene auf deren Essentialität untersucht. Es musste festgestellt werden, dass die Beobachtung des Wachstumsverhaltens über 10 Stunden manchmal nicht ausreichen für die Beurteilung der Essentialität ausreichen sein konnte (Resultate nicht gezeigt). Ausserdem war die Methode mittels Flüssigkultur mit einem enormen Arbeitsaufwand und Materialverbrauch (Küvetten) für die Messungen verbunden.

4.3.5.2. Essentialitätsstudien mit Agarplatten

Alternativ dazu wurde versucht, mittels Ausplattieren und Kultivierung der Platten bei 42°C die Integration des Plasmids zu erzwingen. Hierfür wurden über Nacht Kulturen (bei 30°C) mit 42°C warmen BHI-Erm Medium auf OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt und bei 42°C weiter kultiviert. Wenn die Kulturen eine OD₆₀₀ von 1, 7 und 10 (siehe Abb. 36) erreichen diese so mit 42°C warmen BHI-Erm Medium verdünnen, dass sie eine OD₆₀₀ von 0.001 besitzen. 100µl davon werden auf auf 42°C vorgewärmte BHI-Agar Platten ausplattiert und über Nacht bei 42°C für etwa 16h inkubiert.

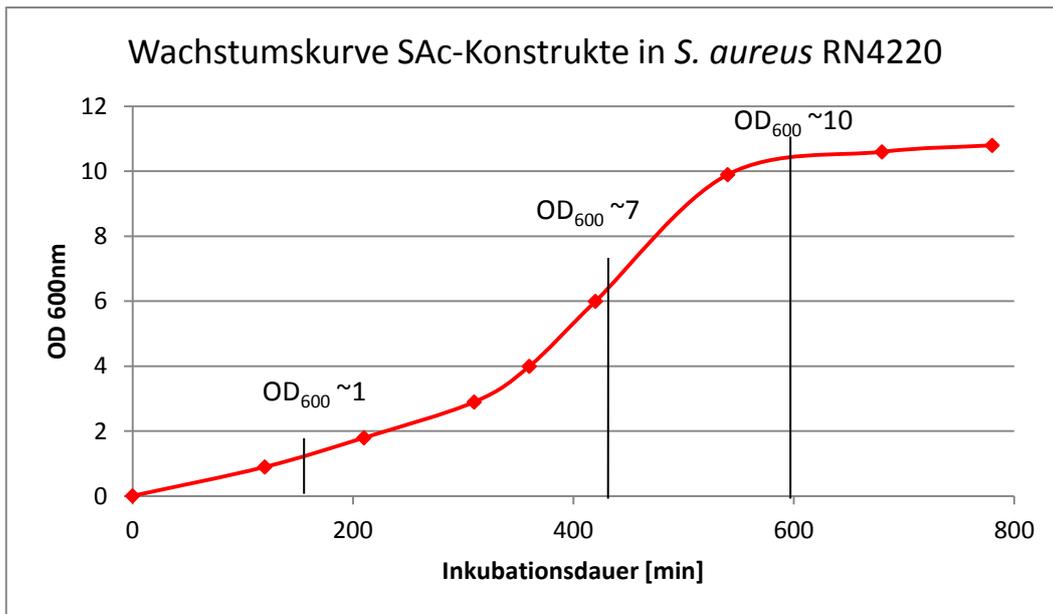


Abb. 36: durchschnittliche Wachstumskurve der *S. aureus* RN4220 Kulturen und Zeitpunkte des Ausplattieren

In Abb. 37 sind die Ergebnisse dargestellt. Es waren 2 Arten von Kolonien sichtbar – große und kleine. Bei diesem Experiment wurde mit dem Vektor pAUL-A in *S. aureus* RN4220 gleich wie mit den anderen Konstrukten verfahren. Da keine Integration des leeren Plasmides in das Chromosom stattfinden kann, dürften auch keine Kolonien auswachsen. Die kleinen Kolonien waren mengenmäßig bei allen Konstrukten, auch bei dem leeren Plasmid pAUL-A, und Verdünnungen annähernd gleich. Dadurch wurde angenommen, dass es sich bei den kleinen Kolonien um Background handelte. Ausschlaggebend für die Interpretation auf Essentialität waren somit nur die großen Kolonien.

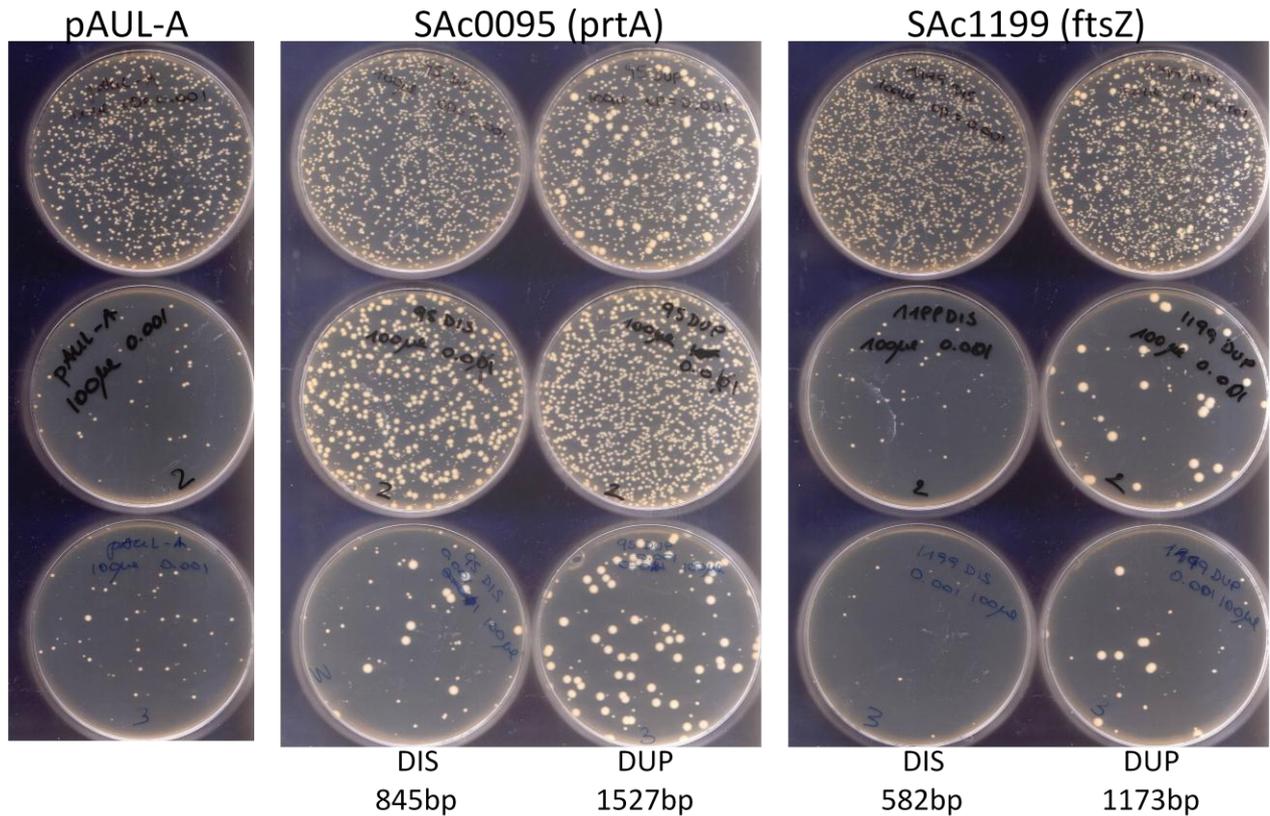


Abb. 37: Ergebnisse der Insertion Duplication/Disruption Mutagenesis
jeweils obere Reihe: Auplattieren bei Zeitpunkt 1 (OD₆₀₀ ~ 1)
jeweils mittlere Reihe: Auplattieren bei Zeitpunkt 2 (OD₆₀₀ ~ 7)
jeweils unterste Reihe: Auplattieren bei Zeitpunkt 3 (OD₆₀₀ ~ 10)

Aufgrund der ersten Ergebnisse wurde das Screening auf Essentialität der *S.aureus* Gene durch Ausplattieren der Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von ~7 durchgeführt. Die Kulturen wurden mit zwei Verdünnungen ausplattiert. Wie in Abb. 38 gut zu erkennen ist, kann man mit dieser Methode gut zwischen essentiellen und nicht essentiellen Genen unterscheiden.

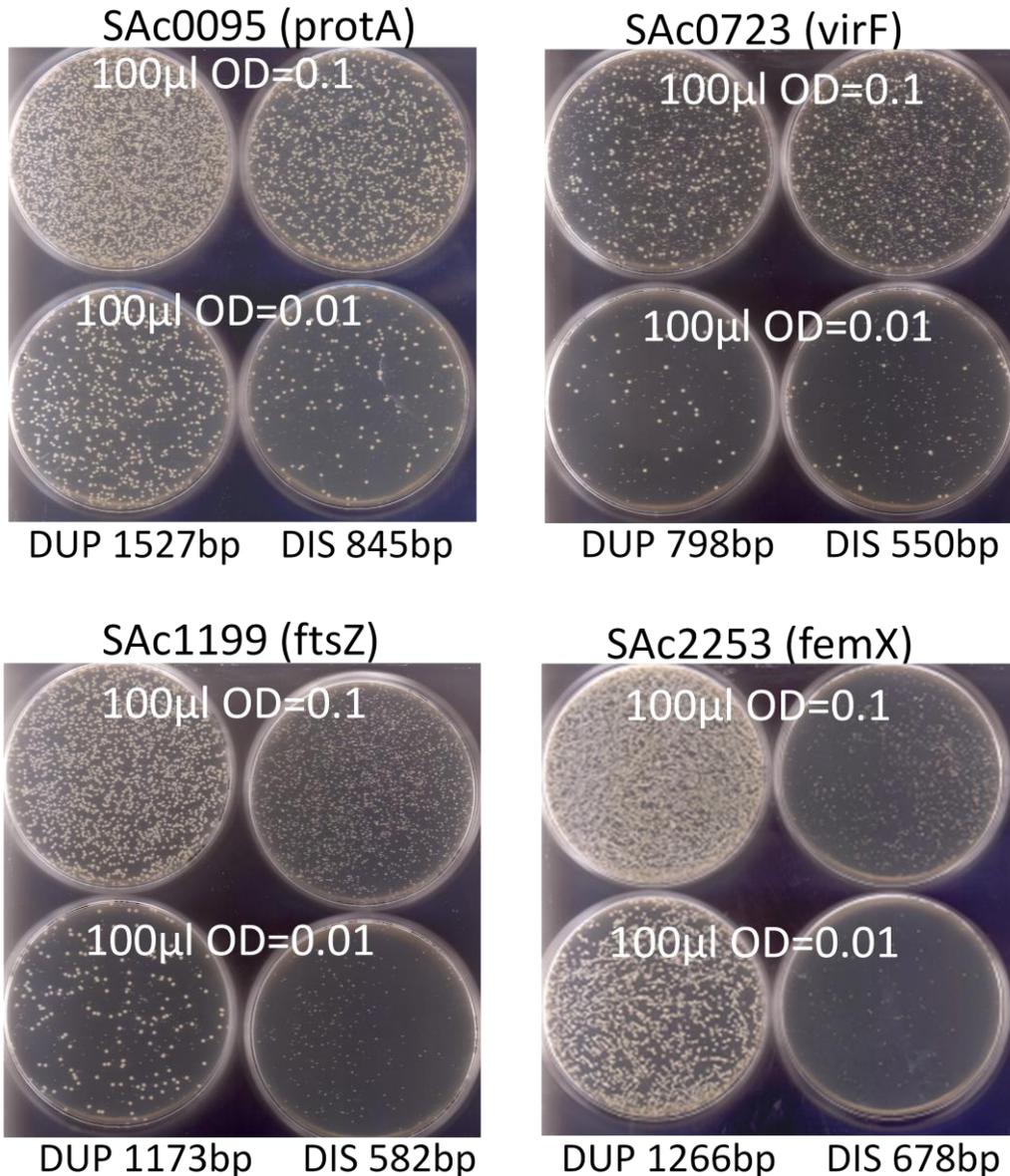


Abb. 38: Ergebnisse der Insertion Duplication/Disruption Mutagenesis
jeweils obere Reihe: Auplattieren von 100µl verdünnter Kultur mit OD₆₀₀ 0.1
jeweils untere Reihe: Auplattieren von 100µl verdünnter Kultur mit OD₆₀₀ 0.01

4.3.6. Überprüfung auf Integration am richtigen Locus in *S. aureus*

Um die Integration der Konstrukte am richtigen Locus zu verifizieren, werden von den nach dem Temperaturshift ausgewachsenen Kolonien PCR's durchgeführt. Der Primer wurden so designed, dass er in der 5' Flanke knapp vor dem Startcodon im Genom bindet. Mit dem dazugehörigen Reverse-Primer für die Disruptions-Konstrukte muss sich ein PCR Produkt amplifizieren lassen. Dies dient als "Positiv" Kontrolle für die PCR. Je nach Orientierung im Vektor muss mit einem der beiden M13 Primer, die flankierend der MCS in Suizidvektor pAUL-A binden, ein entsprechendes Produkt amplifizierbar sein.

Nachfolgend sind repräsentativ die Kontroll-PCR's für ein nicht essentielles Gens (Abb. 39) und ein essentielles Gens (Abb. 40) zu sehen. Die Kontroll-PCR's haben wie erwartet funktioniert und Produkte der gewünschten Größe geliefert.

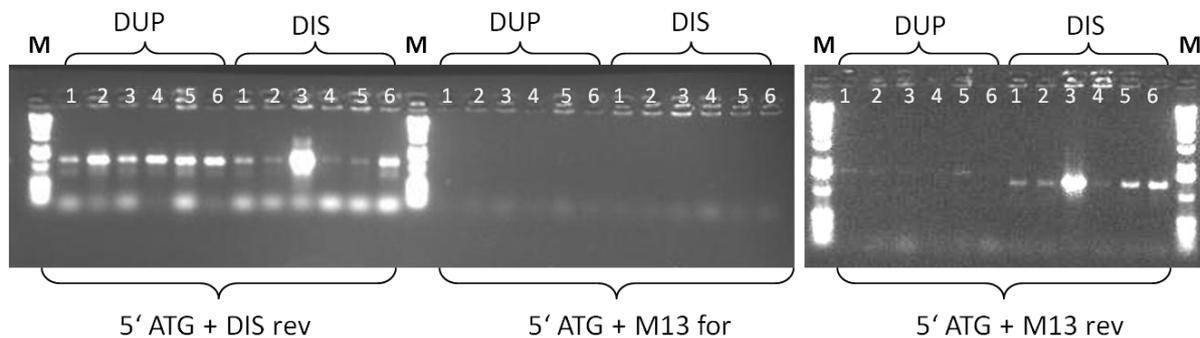


Abb. 39: Kontroll-PCR's von Kolonien der Insertion Duplication/Disruption Mutagenesis eines nicht essentiellen Gens
 5' ATG: Primer, der knapp vor dem Startcodon des entsprechenden Gens bindet
 DIS rev: reverse Primer, der zur Generierung des Disruptionskonstruktes dient
 M13 for/rev: bindet in der MCS von pAUL-A

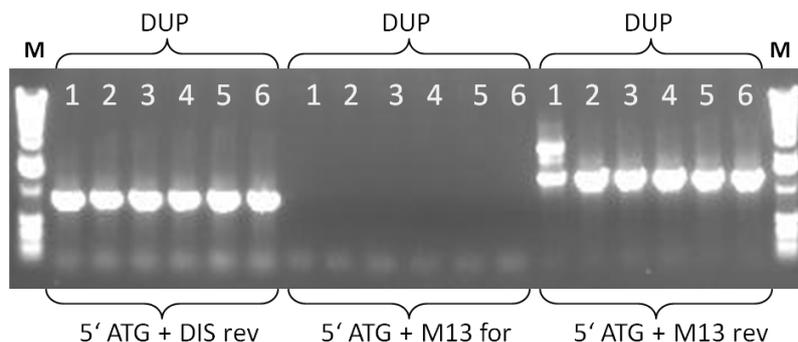


Abb. 40: Kontroll-PCR's von Kolonien der Insertion Duplication/Disruption Mutagenesis eines essentiellen Gens
 5' ATG: Primer, der knapp vor dem Startcodon des entsprechenden Gens bindet
 DIS rev: reverse Primer, der zur Generierung des Disruptionskonstruktes dient
 M13 for/rev: bindet in der MCS von pAUL-A

4.3.7. Anwendung der IDM auf weitere *S. aureus* Gene

Mit dieser Methode wurden 32 weitere Gene auf deren Essentialität hin untersucht. Bei insgesamt 15 Genen konnte mit dieser Methode die Essentialität festgestellt werden, wobei 4 dieser Gene als essentiell mit Polaritätseffekt eingestuft wurden. Bei 4 weiteren Genen wuchsen bei den Duplikationskonstrukten und den Disruptionskonstrukten nur vereinzelt Kolonien aus und es konnte keine Aussage bezüglich Essentialität getroffen werden. Bei diesen Genen würde eine alternative Methode zur Bestätigung der Essentialität nötig sein (nicht Teil dieser Arbeit).

4.4. Etablierung einer knock-out Methode in *H. influenzae*

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, von essentiellen Genen in *S. pneumoniae* orthologen Genen in *H. influenzae* die Essentialität zu bestimmen. Da bereits in *S. pneumoniae* die Allelic Replacement Methode gut funktioniert hat, wird diese auch bei *H. influenzae* angewandt. In der Literatur wurden verschiedene Resistenz-Kassetten zur Selektion aber auch verschiedene Positionen der uptake-sequence beschrieben (13, 16).

Zur Etablierung der Methode wurden folgende Gene ausgewählt:

ftsZ (HI1143): bekannt essentiell in gram positiven und gram negativen Bakterien (39)

mreC (HI0038): MreC spielt eine wichtige Rolle in der Zellwandsynthese und ist essentiell in (21), essentiell in *E. coli* (Pathway kann aber umgangen werden) (38).

igaA1 (HI0990): Bei IgaA1 handelt um eine Protease, die humanes IgaA1 spaltet, es handelt sich somit um einen Virulenzfaktor und ist daher nicht essentiell (41).

ompP2 (HI0139): nicht essentiell (42)

Im ersten Schritt soll die Position der Uptake Sequence (US) ausgetestet werden. Zusätzlich werden auch die Erythromycin-Kassette und die Kanamycin-Kassette zur Selektion verwendet. Welche Positionen der US verwendet wurden, ist in Abb. 41 ersichtlich

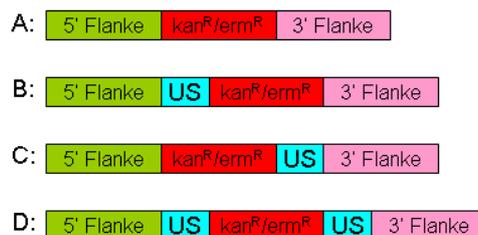


Abb 41: Positionen der uptake-sequence (US) in den Deletionskonstrukten;

- A: keine US,
- B: 5' zur Resistenz-Kassette,
- C: 3' zur Resistenz-Kassette,
- D: 5' und 3' zur Resistenzkassette

4.4.1. Herstellung der linearen 3kbp Fragmente für ARM

Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation der 5' und 3' Fragmente zu den entsprechenden Genen und der einzelnen Resistenz-Kassetten mit den entsprechenden Primerpaaren. Wie in Abb. 42 und 43 ersichtlich ist, haben alle PCR-Produkte die gewünschten Größen und sehr gut funktioniert.

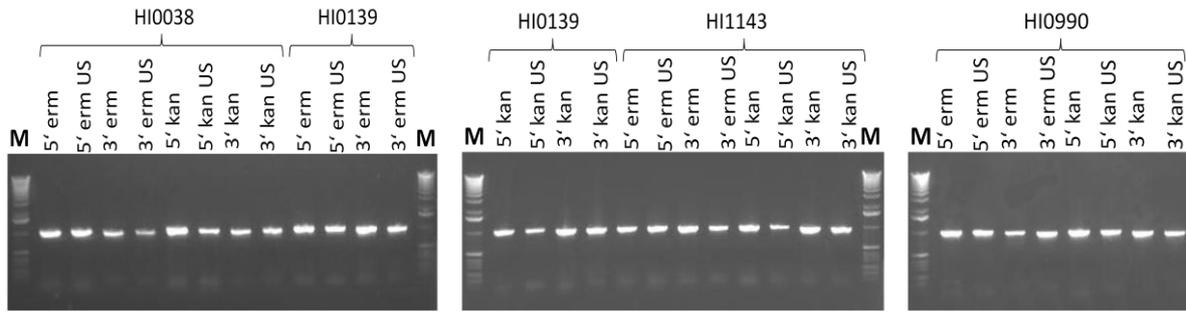


Abb. 42: Amplifikation der 5' und 3' Flanken mit entsprechenden Überhängen

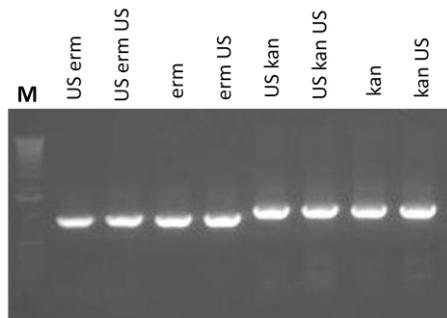


Abb. 43: Amplifikation der Erythromycin (erm)- und Kanamycin (kan)-Resistenzkassette mit der Uptake-Sequenz an der entsprechenden Position

Die einzelnen Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNAs mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II aus der Agarose herausgereinigt. Die DNAs wurden in 45µl EB (1kb Fragmente) bzw. 60µl EB (Resistenz-Kassetten) eluiert.

Mit den entsprechenden Kombinationen mit den 5'- und den 3'- Flanken und dem Resistenz-Kassetten wurden die PCR's für die 3kbp Deletionskassetten angesetzt. Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden je 5µl der PCR-Ansätze zwecks Überprüfung der PCRs auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb.44 und 45). Die Fusions-PCR hat dann gut funktioniert, wenn alle Edukte zu einem 3 kbp großem Fragment verschmolzen sind.

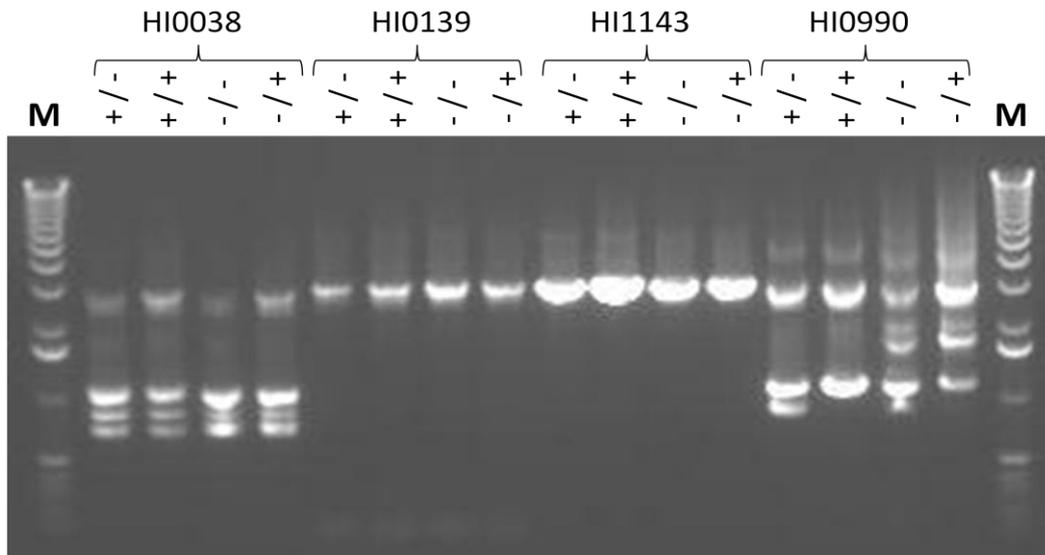


Abb. 44: Amplifikation der 3kb Fragmente mit der Erythromycin-Resistenzkassette

- + / - : 5' Flanke - US - erm - 3' Flanke
- + / + : 5' Flanke - US - erm - US - 3' Flanke
- / - : 5' Flanke - erm - 3' Flanke
- / + : 5' Flanke - erm - US - 3' Flanke

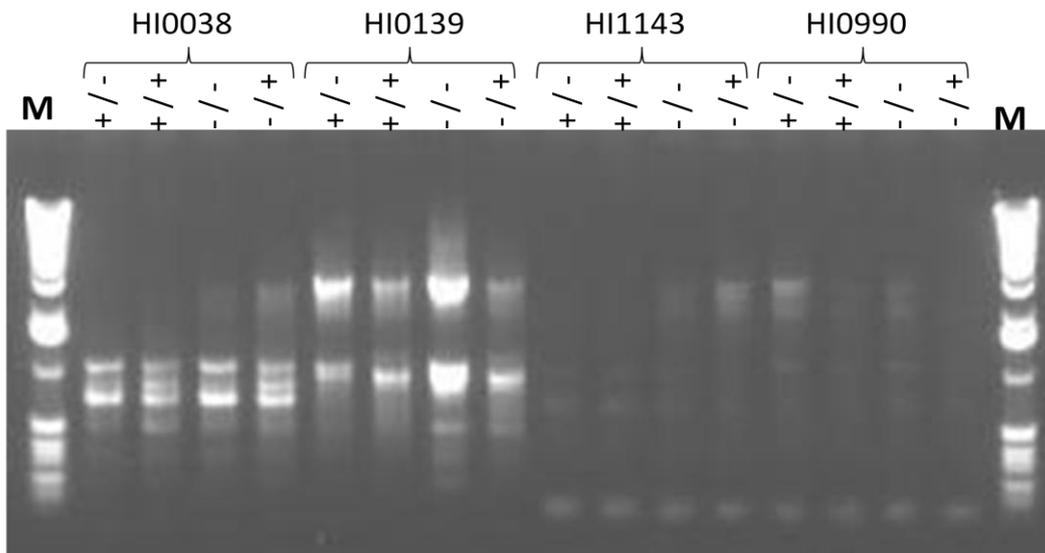


Abb. 45: Amplifikation der 3kb Fragmente mit der Erythromycin-Resistenzkassette

- + / - : 5' Flanke - US - erm - 3' Flanke
- + / + : 5' Flanke - US - erm - US - 3' Flanke
- / - : 5' Flanke - erm - 3' Flanke
- / + : 5' Flanke - erm - US - 3' Flanke

Die Amplifikation der 3kb Fragmente mit der Erythromycin-Kassette funktionierte im ersten Versuch deutlich besser als die mit der Kanamycin-Kassette und somit wurde mit der Erythromycin-Kassette weiter gemacht. Für die Etablierung der Transformation wurden die 3 kbp Deletionsfragmente mit der Erythromycin-Kassette von HI0139 und HI1143 verwendet. Durch Variation der eingesetzten DNA-Menge der Einzelfragmente für die Fusions-PCR konnte für die beiden anderen Gene

(HI0038 und HI0990) das entsprechende 3kbp Deletionskonstrukt amplifiziert werden (siehe Abb. 46).

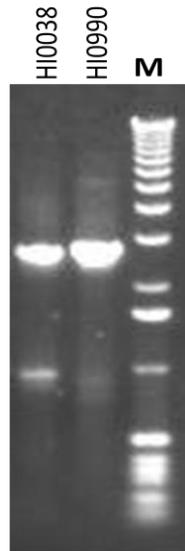


Abb. 46: 3kbp Fragmente mit der Erythromycin-Resistenzkassette (5' Flanke - US - erm - 3' Flanke)

4.4.2. Transformation der Konstrukte und Generierung der Knock-outs

Um das Wachstumsverhalten von *H. influenzae* Rd KW20 zu ermitteln wurde zuerst eine Wachstumskurve ermittelt. Dafür wurden 160µl des Arbeitsstocks von *H. influenzae* Rd KW20 zu 4ml sBHI Medium pipettiert und bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 600nm gemessen. Aus der daraus berechneten Wachstumskurve (Abb. 47) ist ersichtlich, dass einerseits die Bakterien nicht sehr dicht anwachsen und dass das exponentielle Wachstum bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,2 bis 0,5 liegt. Für die Durchführung der Transformation wurde ein OD₆₀₀ Wert von etwa 0,2 gewählt.

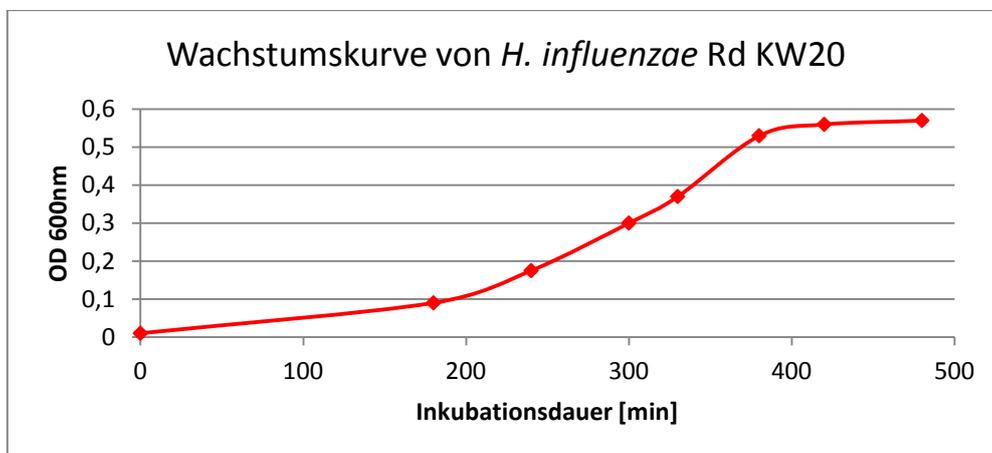


Abb. 47: Wachstumskurve *H. influenzae* Rd KW20

Bei Zalacain *et al* (18) wurde die Transformation der Deletionskassetten in Anwesenheit von CaCl_2 durchgeführt. Bei den ersten Transformationsversuchen wurde deshalb jeder Ansatz einmal mit und einmal ohne CaCl_2 durchgeführt. Ausserdem wurde noch die Dauer der Inkubation der Transformationen vor dem Ausplattieren überprüft. Die Inkubation der Platten erfolgte immer für mindestens 36h, da nach bis zu 24h oft nur sehr kleine Kolonien ausgewachsen waren. Die Platten wurden zur Auswertung eingescannt (siehe Abb. 48). Zur Etablierung der Transformation wurde das 3kbp Deletionsfragment von HI0139 und HI1143 verwendet. Bei allen Transformationen der 3kbp Deletionsfragmente von HI1143 wuchsen keine Kolonien aus.

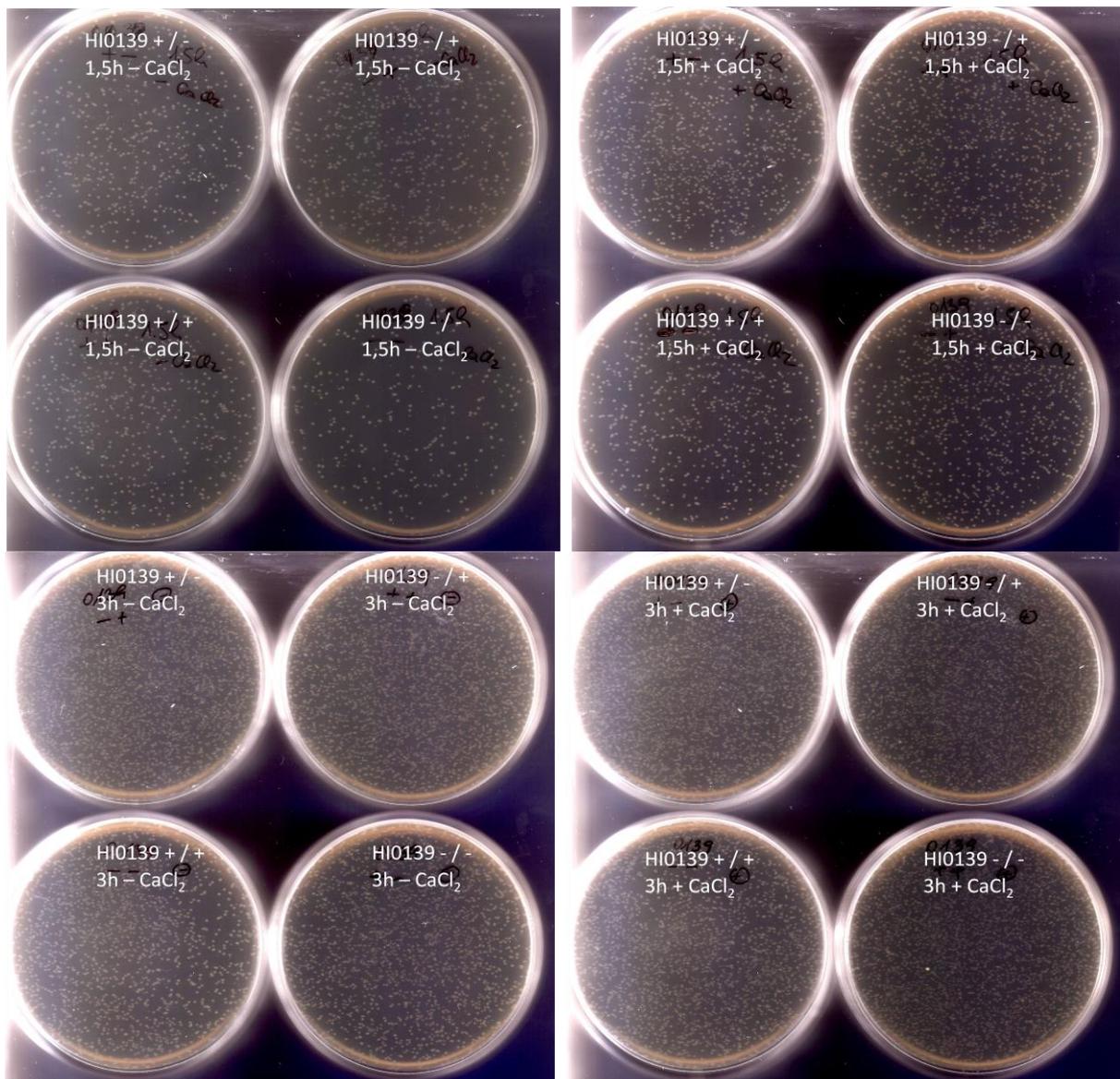


Abb. 48: ausgewachsene Kolonien mit verschiedenen Bedingungen

- + / - : 5' Flanke - US - erm - 3' Flanke
- / + : 5' Flanke - erm - US - 3' Flanke
- + / + : 5' Flanke - US - erm - US - 3' Flanke
- / - : 5' Flanke - erm - 3' Flanke

Wie aus den obigen Abbildungen ersichtlich ist, macht es für die Effizienz der Transformation keinen signifikanten Unterschied, an welcher Position sich die uptake sequence befindet und ob bei der Transformation CaCl_2 eingesetzt wird oder nicht. Sehr wohl hat die Dauer der Inkubation der Transformationsansätze vor dem Ausplattieren einen Einfluss auf die Kolonienanzahl bei nicht essentiellen Genen. Optimal wäre eine Kolonienanzahl von etwa 500 bei nicht essentiellen Genen, damit man gut zwischen essentiellen und nicht essentiellen Genen unterscheiden kann.

Folgende Bedingungen wurden standardmäßig für die weiteren knock-outs verwendet:

- Erythromycin-kassette → PCR Fragmente lassen sich besser fusionieren
- uptake sequence an 5' Seite der Erythromycin-Kassette
- Transformation ohne CaCl_2 – kein wirklicher Unterschied zu sehen
- Inkubation der Transformationen 3h vor dem Ausplattieren
- Inkubation der Platten für mindestens 36h

4.4.3. Anwendung der ARM auf weitere *H. influenzae* Gene

Es wurden 198 zusätzliche Gene von *H. influenzae* für die Allelic Replacement Mutagenesis ausgewählt. Auch hier war bei fast allen Genen war die Amplifikation der schlussendlich 3kbp Fragmente möglich. Bei vier Genen (HI0xx8, HI 1xx9, HI0xx4, HI1xx0) war es trotz mehrmaliger Versuche nicht möglich, die 5' Flanke zu amplifizieren. Bei zwei weiteren Genen (HIxx13, xx04) war es trotz mehrmaliger Versuche nicht möglich, die 3' Flanke zu amplifizieren. Auch ein Design neuer Primer konnte keine gewünschten Ergebnisse liefern.

Es wurden die 3kbp Fragmente aller Gene zweimal von der Amplifikation der 1kbp Fragmente beginnend hergestellt und insgesamt dreimal (das erste 3kbp Fragment zweimal und das zweite 3kbp Fragment einmal) in *H. influenzae* transformiert. Von den insgesamt 202 untersuchten *H. influenzae* Genen konnten 63 als essentiell eingestuft werden. Bei 4 weiteren Genen wuchsen nur 1-4 Kolonien aus.

5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, Methoden zur Bestimmung der Essentialität eines Genes zu etablieren. Da eine Vielzahl von Genen untersucht werden soll, sind Methoden gesucht, bei denen an einigen Genen gleichzeitig gearbeitet werden kann. Ein weiterer Aspekt bei der Wahl der geeigneten Methode ist deren Zuverlässigkeit auf die Vorhersage der Essentialität. Außerdem sollten die Ergebnisse nach relativ kurzer Zeit vorliegen können und mit wenigen nachfolgenden Experimenten interpretiert werden können. Wichtig ist es auch, dass ausgewählte Gene untersucht werden können.

Transposonbasierende Methoden wie z.B. mit GAMBIT (12), TnAraOut (14) oder in vitro Transposonmutagenese mittels *Tn_{magellan4}* (15) eignen sich hervorragend um in vivo essentielle Gene zu analysieren. Zusätzlich kann man dabei auch noch spezifische Gene und Regionen analysieren. Da eine hohe Anzahl an Transposon-Insertionen nötig ist, ist eine effiziente Transformierbarkeit eine Grundvoraussetzung. Deswegen eignen sich natürlich kompetente Organismen wie *S. pneumoniae* und *H. influenzae* besonders gut für diese Methode. Bei GAMBIT wird für die Gesamtanalyse eines Genoms eine Vielzahl an Primer benötigt (ca 130 Primer pro Mbp DNA). TnAraOut Mutagenese eignet sich gut für eine High Throughput Analyse, aber ist eigentlich nur gut für Gram-negative Bakterien geeignet. Bei allen gemeinsam ist die Wahl der Selektionsbedingungen für die Aussagekraft entscheidend. Ausserdem sind nachfolgend einige Analysen notwendig, um eine Aussage bezüglich der Essentialität eines Gens treffen zu können. Alle transposonbasierenden Methoden haben zusätzlich den Nachteil, dass die Transposons die Fähigkeit besitzen, zwischen und innerhalb des Organismus zu springen.

Die RNA antisense Technologie wurde für Studien in *S. aureus* entwickelt(24). Es bedarf aber einem enormen Screeningaufwand und eine Vielzahl an Sequenz- und bioinformatischen Analysen um essentielle Gene zu verifizieren.

Nach intensiver Literaturrecherche wurden die verwendeten Methoden ausgewählt. Der erste Screen wurde in *S. pneumoniae* durchgeführt. Bei einem Set von 24

Genen, die vorhergesagt essentiell und nicht essentiell sein sollten, wurde die ARM und die IDM durchgeführt. Die Transformationseffizienz der linearen 3kbp Deletionskassetten war weit höher, als die der Disruptionskonstrukte. Dadurch könnten fehlende Kolonien nach der Transformation auf die Essentialität des Genes schließen lassen, obwohl eigentlich die Transformation nicht ordentlich funktioniert hat. Dadurch erhalten die Ergebnisse der Deletionskonstrukte mehr Aussagekraft. Bei einem nicht-essentiellen Gen wuchsen mit den linearen Fragmenten durchschnittlich 500 Kolonien auf den Blutagarplatten, bei einem essentiellen gar keine. Bei der Gendisruptionsmethode wuchsen bei einem nicht-essentiellen Gen nur maximal 13 Kolonien. Durch das Ergebnis „keine Kolonien“ nach der Transformation mit den Disruptionskonstrukten konnte nicht eindeutig auf ein essentielles Gen geschlossen werden.

Die mittels Gendisruption erhaltenen Resultate der KO-Experimente sind nicht immer als eindeutig anzusehen, da auch das downstream gelegene Gen durch die Insertion des Vektors beeinflusst werden könnte. So würden upstream gelegene Promotoren, welche die Transkription in polycistronischer DNAs auch weiter downstream gelegene Gene beeinflussen, nicht mehr auf die downstream-Gene wirken, da sich Transkriptionsterminatoren in pJDC9, befinden. Diese so genannten Polaritätseffekte würden zu falsch positiven Resultaten für das Zielgen hinsichtlich seiner Essentialität führen.

Es können aber auch nur Teile des Zielgens inaktiviert werden, wobei die aktiven Domänen des Proteins erhalten bleiben, was auf eine Reaktivität des Genes zurückzuführen wäre. Dies würde zu falsch negativen Resultaten für das Zielgens hinsichtlich seiner Essentialität führen.

Ein weiterer Nachteil der Gendisruptionsmethode ist, dass bei kleinen Genen auch nur kleine Disruptionsfragmente generiert werden können, was wiederum zu einer Verminderung der Transformationseffizienz führt, da für eine optimale Rekombination ins Genom ungefähr 400 bis 500bp homologe Sequenz notwendig ist.

Durch die Anwendung der Deletionskassetten für den Austausch des Zielgens mit der Kanamycinkassette können die vorhergehend beschriebenen Polaritätseffekte

und somit falsch positive Resultate bezüglich Essentialität vermieden werden, weil nachfolgende Gene in Bezug auf ihre Expression nicht beeinflusst werden, da diese vom Kanamycin-Promotor angetrieben werden. In dem in Abb. 48 beschriebenen Fall ist das *S.pneumoniae* Gen SPxxx5 essentiell und liegt downstream vom nicht-essentiellen SPxxx4 innerhalb eines Operons. Bei der Anwendung der Disruptionsmethode zur Bestimmung der Essentialität von SPxxx4 würden wahrscheinlich keine Kolonien auswachsen, weil die Expression von SPxxx5 durch die Integration des Suizidvektors pJDC9 in das Chromosom verhindert werden würde. Durch die „saubere“ Deletion von SPxxx4 und Austausch mit der Kanamycinkassette wachsen bei der Gendeletionsmethode genügend Kolonien aus, was wiederum eine falsche Interpretation bezüglich Essentialität von SPxxx4 verhindern würde.

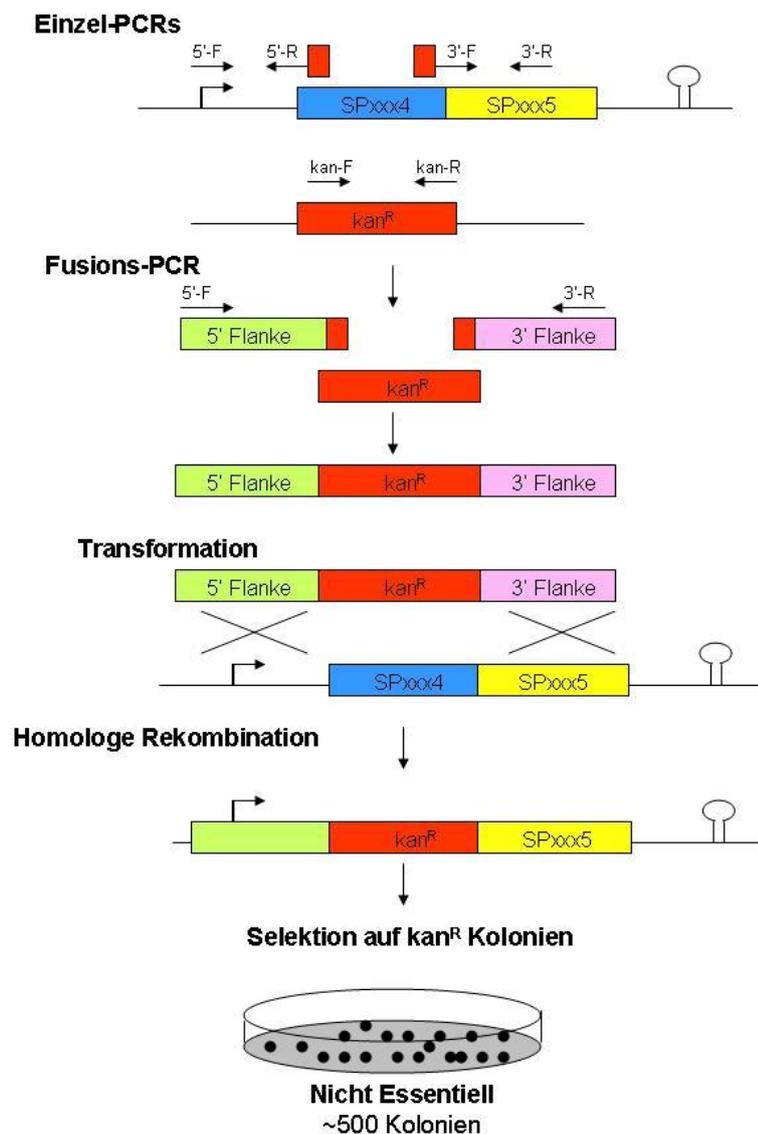


Abb.48: Polaritätseffekt, SPxxx5 ist ein essentielles Gen

Vom Arbeitsaufwand her ist die Gendeletionsmethode ebenfalls rascher durchführbar. Außerdem sind bei dieser Methode parallel mehr Gene auf Essentialität untersuchbar als bei der Gendisruptionsmethode.

Mit ARM wurden in *S. aureus* ebenfalls Essentialitätsstudien durchgeführt (17). Es mussten aber bis zu 2000 Klone untersucht werden, um ein Gen als essentiell in vitro einstufen zu können. Dies wiederum bedeutet einen enormen Arbeits- und Zeitaufwand seitens des Screenings.

Deswegen wurde sich bei *S. aureus* für die IDM entschieden. Die Konstruktion aller Duplikations und Disruptionskonstrukte stellte bei keinem der nötigen Schritte ein Problem dar. Im ersten Ansatz wurde versucht, die Integration der Suizid-Vektoren in das *S. aureus* Genom durch den Temperaturshift in Flüssigkultur zu erzwingen. Dies stellte sich als nicht optimal heraus. Bei manchen Genen wäre der Zeitaufwand zu enorm gewesen, um anhand des Wachstumsverhaltens auf die Essentialität schliessen zu können. Es bestand auch die Gefahr, dass einzelne Mutanten sich an die zeitlich langfristige erzwungenen Bedingungen anpassen könnten und dadurch mit der Zeit den Phänotypen eines nicht essentiellen Genes aufweisen. Diese Theorie wurde insofern bestätigt, da bei den Essentialitätsstudien auf Platten immer ein Background an sehr kleinen, aber gleichmässig vielen Kolonien auswuchs. Welcher genaue Mechanismus dem dahinter steht konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht bearbeitet werden.

Durch die Integration der Duplikationskonstrukte soll ein intaktes Gen im Bakterium vorhanden sein und der Wachstum eigentlich nicht gehemmt werden. Bei Nichtwachstum von Kolonien bei Duplikations- UND Disruptionskonstrukten konnte daher auf Essentialität mit Polaritätseffekt geschlossen werden.

In *H. influenzae* gibt es bei einigen zu in *S. pneumoniae* essentiellen orthologen Gene mehr als ein orthologes Gene. Bei zwei orthologen Genen ist oft eines der beiden essentiell und das andere nicht essentiell. In dem Fall das beide oder bei mehreren vorhandenen orthologe Genen die Essentialität der einzelnen nicht bestätigt werden kann, kann durch die Anwendung der ARM Doppel-knock-outs durchgeführt

werden. Das 3kbp Fragment des zweiten Genes wird in dabei mit einer alternativen Antibiotikaresistenzkassette hergestellt und in die erste ARM-Mutante transformiert. Die Selektion erfolgt dabei auf beide Antibiotika. Wenn beide Gene in Kombination essentiell sind, dann würden dabei keine Kolonien auswachsen (nicht Teil dieser Arbeit).

6. Zusammenfassung

Die rasante Zunahme der Entwicklung neuer Resistenzen gegen die wichtigsten Antibiotikaklassen zur Behandlung pathogener Bakterien macht es notwendig, neue Wirkstoffziele zu bestimmen. Dabei ist auch zu achten, dass es keine Homologien mit *H. sapiens* Genen vorhanden ist. Das Vorhandensein von vielen durchsequenzierten Genomen macht es möglich, mittels bioinformatischer Analysen Cluster an homologen Proteinen zu bestimmen. Durch gezielte Deletion oder Disruption der entsprechenden Gene kann deren Essentialität zum Überleben des Keimes bestimmt werden.

Als geeignete Methode für die Bestimmung der Essentialität in *S. pneumoniae* und *H. influenzae* war die Allelic Replacement Methode (ARM), bei der das zu untersuchende Gen durch doppelte homologe Rekombination mit der 5'- und 3'-Flanke des Gens mit einer Antibiotikakassette ausgetauscht wurde. Die Deletionskonstrukte konnten einfach mittels Fusions-PCR hergestellt werden. Für *S. aureus* wurde die Insertions Disruption Mutagenesis (IDM) mittels temperatursensitiven Suizidvektor pAUL-A angewandt. Durch einen Temperaturshift von 30°C auf 42°C musste das Plasmid um überleben zu können ins das Genom integrieren. Durch einfache homologe Rekombination wurde das Zielgen auseinandergerissen. In *S. pneumoniae* wurden 220 Gene auf deren Essentialität hin untersucht, wovon 57 als essentiell eingestuft werden konnten. 63 von 202 untersuchten *H. influenzae* Gene konnten ebenfalls als essentiell eingestuft werden. Mittels. In *S. aureus* wurden insgesamt 36 Gene auf Essentialität untersucht. Bei 15 *S. aureus* Genen konnte diese gezeigt werden. Bei 4 weiteren Genen müssen noch alternative Methoden angewendet werden um deren Essentialität zu bestätigen.

Abstract

The rapid increase in development of new resistances against the most important classes of antibiotics for the treatment of pathogenic bacteria makes it necessary to identify new drug targets. Additionally there must be paid attention that there is no homology to *H. sapiens* genes present. The availability of many sequenced genomes makes it possible to determine clusters of homologous proteins through bioinformatic analyses. By targeted deletion or disruption of the corresponding genes the essentiality for the survival of the bacterium can be identified.

The method of choice for determination of the essential genes of *S. pneumoniae* and *H. influenza* was the allelic replacement method (ARM). The gene of interest was exchanged with an antibiotic resistance cassette using using double homologous recombination with the 5'- and 3'flank of the gene. The deletion constructs were produced with fusion-PCR. For *S. aureus* the insertion disruption mutagenesis (IDM) with the aid of the temperature sensitive suicidal vector pAUL-A. To survive a shift of temperature from 30° C to 42° C the plasmid was forced to integrate into the genome. By single homologous recombination the target gene was torn apart.

In *S. pneumonia* 220 genes were tested for their essentiality and 57 genes could be identified as essential. 63 out of 202 evaluated genes of *H. influenzae* also could be rated as essential. 36 genes of *S. aureus* have been investigated, 15 of them could be classified as essential. Another 4 genes have to be examined using other methods to approve their essentiality.

7. Anhang

7.1. Gensequenzen

Da aus eventuellen zukünftigen patentrechtlichen Ansprüchen die genauen Sequenzen der untersuchten Gene nicht angeführt werden können, wird als Beispiel für das Primerdesign für die einzelnen Versuche *ftsZ* angeführt.

7.1.1 *ftsZ* (SP1666) in *S. pneumoniae* TIGR4

DIS for: 5'-ATATAT GGATCC CCAGATGTTCACTCCTTGACCTG-3'

DIS rev: 5'-ATATAT GGATCC GGAGCTGCTCCTGTTATTGCTCG-3'

5' sense: 5'- ATTGTGGATGGTTTCCAAGGG-3'

5' rev: 5'- CGACGGAGCCGATTTTGAAC TTAATCACTGCCCTTGAGC-3'

3' for: 5'- CGAGCGCCTACGAGGAATTT GAAGATGAATTGGATACACCTCC-3'

3' rev: GAACATCTATAATGACCTTATCCG-3'

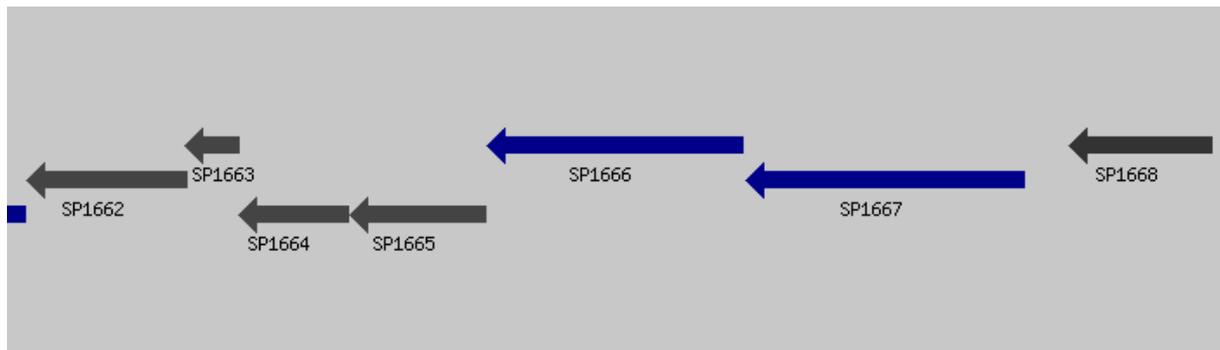


Abb.49: Lage des *ftsZ* (SP1666) innerhalb des Genoms

ftsZ Sequenz mit eingezeichneten Primern für Disruptionskonstrukte

>SP1666

```
ATGACATTTTCATTTGATACAGCTGCTGCTCAAGGGGCAGTGATTAAGTAATTGGTGTCCGGTGGAGGTGGTGGC
AATGCCATCAACCGTATGGTCGACGAAGGTGTTACAGGCGTAGAATTTATCGCAGCAAACACAGATGTACAAGCA
TTGAGTAGTACAAAAGCTGAGACTGTTATTTCAGTTGGGACCTAAATTGACTCGTGGTTTGGGTGCAGGAGGTCAA
CCTGAGGTTGGTCGTAAGCCGCTGAAGAAAGCGAAGAAACACTGACGGAAGCTATTAGTGGTGCCGATATGGTC
TTCATCACTGCTGGTATGGGAGGAGGCTCTGGAACTGGAGCTGCTCCTGTTATTGCTCGTATCGCCAAAGATTTA
GGTGCCTTACAGTTGGTGTGTAACACGTCCTTTGGTTTTGAAGGAAGTAAGCGTGGACAATTTGCTGTAGAA
GGAATCAATCAACTTCGTGAGCATGTAGACACTCTATTGATTATCTCAAACAACAATTTGCTTGAAATTGTTGAT
AAGAAAACACCGCTTTTGGAGGCTCTTAGCGAAGCGGATAACGTTCTTCGTCAAGGTGTTCAAGGGATTACCGAT
TTGATTACCAATCCAGGATTGATTAACCTTGACTTTGCCGATGTGAAAACGGTAATGGCAAAACAAAGGGAATGCT
CTTATGGGTATTGGTATCGGTAGTGGAGAAGAAGCGTGTGGTAGAAGCGGCACGTAAGGCAATCTATTCACCACTT
CTTGAAACAACACTATTGACGGTGCTGAGGATGTTATCGTCAACGTTACTGGTGGTCTTGACTTAACCTTGATTGAG
GCAGAAGAGGCTTCACAAATTGTGAACCAGGCAGCAGGTC AAGGAGTGAACATCTGGCTCGGTA CTCAATTGAT
GAAAGTATGCGTGATGAAATTCGTGTAACAGTTGTTGCAACGGGTGTTTCGTCAAGACCGCGTAGAAAAGGTTGTG
GCTCCACAAGCTAGATCTGCTACTA ACTACCGTGAGACAGTGA AACCGCTCATTACATGGCTTTGATCGTCAT
TTTGATATGGCAGAAACAGTTGAATTGCCAAAACAAAATCCACGTCGTTTGGAAACCAACTCAGGCATCTGCTTTT
GGTGATTGGGATCTTCGCCGTGAATCGATTGTTTCGTACAACAGATTCAGTCGTTTTCTCCAGTCGAGCGCTTTGAA
GCCCCAATTTCAACAAGATGAAGATGAATTGGATACACCTCCATTTTTTCAAAAATCGTTAA
```

ftsZ Sequenz mit 1000bp Flanken und eingezeichneten Primern für Deletionskassette

>chromosome *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Nucleotides 1564447 - 1567706 Forward Strand)

```

ACTTTCGTTTTCTGCCAATAAATCAACAATTTCTGTTGCATCCTCATATTTTCTAGGATAAC GAA
CATCTATAATGACCTTATCCGTTGCACGCTGACTCTGATTTGCCAATTCCTGTTGTCTTGCATGA
AGTCTGGTGATATTGTTCTCTTTTTGTGCCAGCCGACTGTGAAGGTTGATTCATTGGGAGAGCCGG
TTCCTGTGAAGAATTTACTGAAGTAAACACAGGCTCATCTCTTTTTTTCATAAGGGAGACTTGAAT
CCTCATCCTCCGTAAAATAATCTATAAATCTATCGAATCTATCTTTTTAAAGACATGGTTCTCTCC
TACTTAAAAAATGATGTACCTATACGAACAAAAGTGAACCGAATTGAATCGCTTCTTTATAATC
ACGACTCATTCCCATACTTAACTCGGTTCATAGGCATATTTGGAATTTGTTTCTCTTGAATTTCTC
TTTTGTAAATCTTGGGCCGCTTGAATACTCTTTCAACTGCTCACTGCTAGCCTCAAAAAGGTGCC
ATCGTCATTAACCAACATATTCAATCTTATCTAGTCTGGCTAACTCTGGCAAGATTTCCAGCAG
TTCCTCTCTCGAAAAACCGTGTGTTGCTTTCTTTTAGAAATATTTACTTGAAGGAAACACTTGA
TGACTCGGTCACTTCTTTTTTGAATTTCCCCTGCTAGCTTTACTGAGTCCAATGCATGGAAATAA
TCAACGTATTGAATGACATCTTTACCTTACGTCTTTGCAAGGTACCAATCAAATGCCAAGTCAC
ATCTCGATCTTTTAAAGCTTCATATTTTTCCAGAACTTATCTACACGATTTTACCAGATATGAT
GGACACTAGCGGAAGCAAGGCTTCCGCTGTCGGTACATCTACATACTGGTAACACTGCAATGACA
GAGACCGAACCCTCTCTCGATGAGCACTCAGACTAGCCTCTGCAACTTCTCGAAAAACAAGTTC
TGTATTTTCTTTTACATTCATTTAC
TTAACGATTTTTGAAAAATGGAGGTGTATCCAATTCATCTTCATCTTGTGAAATGGGGCTTCAA
AGCGCTCGACTGGAGAAACGACTGAATCTGTTGTACGAACAATCGATTCACGGCGAAGATCCCAA
TCACCAAAGCAGATGCCTGAGTTGGTTCCAAACGACGTGGATTTTGTGTTGGCAATTCAACTGT
TTCTGCCATATCAAATGACGATCAAAGCCATGTGAATGAGCTGGTTTCACTGTCTCACGGTAGT
TAGTAGCAGATCTAGCTTGTGGAGCCACAACCTTTTCTACGCGGTCTTGACGAACACCCGTTGCA
ACAACGTGTACACGAATTTTCATCACGCATACTTTTCATCAATTGAAGTACCGAGCCAGATGTTTCA
TCCTTGACCTGCTGCCTGGTTTACAATTTGTGAAGCCTCTTCTGCCTCAATCAAGGTTAAGTCAA
GACCACCAGTAACGTTGACGATAACATCCTCAGCACCGTCAATAGTTGTTTCAAGAAGTGGTGAA
TAGATTGCCTTACGTGCCGCTTCTACCACACGTTCTTCTCCACTACCGATACCAATACCCATAAG
AGCATTCCCTTTGTTTGGCATTACCGTTTTTCACATCGGCAAAGTCAAGGTTAATCAATCCTGGAT
TGGAATCAAATCGGTAATCCCTTGAACACCTTGACGAAGAACGTTATCCGCTTCGCTAAGAGCC
TCCAAAAGCGGTGTTTTCTTATCAACAATTTCAAGCAAATTTGTTGTTTGGATAATCAATAGAGT
GTCTACATGCTCACGAAGTTGATTGATTCTTCTACAGCAAATTTGTCACGCTTACTTCTCTCAA
AACCAAAGGACGTGTTACAACACCAACTGTAAGCGCACCTAAATCTTTGGCGATACGAGCAATA
ACAGGAGCAGCTCCAGTTCCAGAGCCTCCTCCCATACCAGCAGTGATGAAGACCATATCGGCACC
ACTAATAGCTTCCGTCAGTGTGTTTCTTCGCTTTCTTCAGCGGCTTTACGACCAACCTCAGGTTGAC
CTCCTGCACCCAAACCACGAGTCAATTTAGGTCCCAACTGAATAACAGTCTCAGCTTTTGTACTA
CTCAATGCTTGTACATCTGTGTTTGTGCGATAAATTTACGCTGTAAACACCTTCGTCGACCAT
ACGGTTGATGGCATTGCCACCACCTCCACCGACACCAATTACTTTAATCACTGCCCTTGAGCAG
CAGCTGTATCAAATGAAAAATGTCAT
AATTTATTTTTCTCTTTATTTCGTCAAACATGCTTCCGATCAATCCACGGAAACGATCTGCTAAT
TTCGGTTTTATTTGTGAAGCTTGTGGAAATCCGCCATTGGTTCTGTAGGCGCCACCGGCTCTAC
TTCTGGAGCAGGAGCTGGTTGAACAGGCGTTGATTGTACAAACTGAGCTGTTTTTGCAGCATCC
CACCAAACCTAATTGGCTGATGACTTAAGTCATTCTCACCTTTTATCGCTCCCTGAGCCAAAAGA
TTAACTTCTGTTAATTGACCCGCAAATTTCTGATAAACTAATCACATGCGCAAAGGCTGGATTACG
GATACCAACTTGATTTGGAACATAAAGCTTGCACGGACGCCAAAAGACTTCTTGAGCAAGCTCAA
CCATACCTGGTAAAATGGCATTCCACCGATTAAGACAATACCACCAGGGAGGTCCAATAGACGC
CTTCTATCTAATTCTTGCTTGATTTGTTCAAGGATGTGCTTGATTTCGTGCAGAAATAATTTCTGA
CAAGTAGGCTTCCGTCACCTCGACTGCTTCTACTTCTCCAATAACCTTACTTGGAAAGGTTTCTT
TGCTTGAAGAGGCGGATAGGCTTCCCGTAATTCAGTTTCAAGCCTTCCGCTAATTTGCGAGAG
GTTTTCAAACCTTGGAGATATCTTTAGTTACATAATCTCCACCTTCTTGGAGAATATAGTGTGAA
CTGGAGTTCTTGATTACGGATTGTAGCAGACAGTCGTTTACCTGCCCCCATATCAATCACTGTAG
CACCAAATTCAGTTCCCTTTCGTTCAAACAGACTGAACCATTGCTAGTGGTGAAATGATAACA
TTTTCAACCTGAACACCTGCACGCTCAACCGTCTTACGCAAATTTGTGCAAGATAGTACGAGGTCC
TGTATAAAGCAAACCACGATTTCAAGGCGAACCCCATCATGCCACGTGGGTACGAAATCCCTT
GGAAACCATCCACAATAAATTCTTC

```

3'

ftsZ

5'

7.1.2. ftsZ (SAc1199) in *S. aureus* COL

SAc1199 DUP for: 5'-ATATAT GGATCC ATGTTAGAATTTGAACAAGGATTI-3'
 DUP rev: 5'-ATATAT GGATCC TTAACGTCTTGTTCTTCTTGAAC-3'
 DIS for: 5'-ATATAT GGATCC ACACGTGGTTTAGGAGCAG-3'
 DIS rev: 5'-ATATAT GGATCC ACCTTGTGCACCAACGATAG-3'
 Kontrollprimer: 5'- TTGGCCAATAAAACTAGGAGG-3'

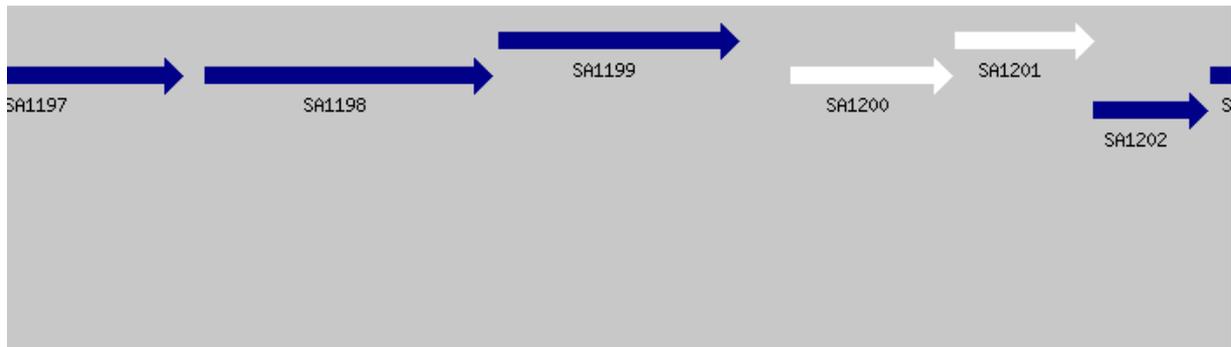


Abb. 50: Lage des ftsZ (SP1199) innerhalb des Genoms

FftsZ Sequenz mit ~200bp Flanken und eingezeichneten Primern

>Staphylococcus aureus subsp. aureus COL 1204368-1207540

```

ATTGGTTTAAACGTAAAACAAACAAAAAGATACTCATGAAAATGAAGTAGAGTCAACAG
ATGAAGAAATTTATCAATCAGAAGATAATCATCAGGAACATAAACAGAATCATGAACATG
TTCAAGACAAAGATAAAGATAAAGAAGAAAGTAAATTCAAAAACTAATGAAATCTCTAT
TTGAATGATTA TTGGCCAATAAAACTAGGAGG AAATTTAA
ATGTTAGAATTTGAACAAGGATTI AATCATTTAGCGACTTTAAAGGTCATTGGTGTAGGT
GGTGGCGGTAACAACGCCGTAAACCGAATGATTGACCACGGAATGAATAATGTTGAATTT
ATCGCTATCAACACAGACGGTCAAGCTTTAAACTTATCTAAAGCTGAATCTAAAAATCCAA
ATCGGTGAAAAATTA ACACGTGGTTTAGGAGCAG GAGCTAATCCTGAAATCGGTAAAAAA
GCTGCAGAGGAATCTCGTGAACAAATTGAAGATGCAATCCAAGGTGCAGACATGGTATTT
GTTACTTCTGGTATGGGTGGCGGAAGTGGTACTGGTGCAGCACCAGTCGTTGCTAAAAAT
GCAAAAGAAATGGGCGCATTAACTGTTGGTGTGTAACTCGTCCATTTAGTTTTGAAGGA
CGTAAACGTCAAACCTCAAGCTGCTGCTGGAGTAGAAGCTATGAAAGCTGCAGTAGATACA
TTAATCGTTATACCAAATGACCGTTTTATTAGATATCGTTGACAAATCTACGCCAATGATG
GAAGCATTTAAAGAAGCTGACAACGTGTTACGCCAAGGTGTACAAGGTATCTCAGACTTA
ATCGCTGTTTCTGGTGAAGTAACTTAGACTTTGCAGACGTTAAGACAATTATGTCTAAC
CAAGGTTCTGCATTAATGGGTATTGGTGTCTTCTGGTGAAAAATAGAGCGGTAGAAGCT
GCTAAAAAAGCAATCTCTCTCCATTACTTGAAACAT CTATCGTTGGTGCACAAGGT GTG
CTTATGAATATTACTGGTGGCGAGTCATTGTGATTATTTGAAGCACAAGAGGCTGCTGAT
ATTGTCCAAGATGCTGCAGATGAAGACGTTAATATGATTTTCGGTACAGTTATTAATCCT
GAATTACAAGATGAGATTGTTGTAACAGTTATTGCAACTGGTTTTGATGACAAACCAACA
TCACATGGTCGTAAATCTGGTAGCACTGGATTTCGGAACAAGCGTAAATACTTCTAGCAAT
GCAACTTCTAAAGATGAATCATTCACTTCAAATTCATCAAATGCACAAGCAACTGATAGT
GTAAGTGAAAGAACACATACAATAAAGAAGATGATATTCCTAGCTTCATTAGAAAATAGA
GAAGAAAGACGTTCAAGAAGAACAAGACGTTAA
TCGGTTAATATATATACACAAATAATTCAACACAAATCATCAGATAACATATCTGATGAT
TTTTTTACTAATTTTTAGAACATGTAGAAGGACATTTAAGTTTTTCAAAGTTATTTAAAAG
TGTTTAAGTATCGTGTGAAAATTAAGTCAAAAATTTTACGCAACATTTTAACTTTAAA
CATAAATGTTATATTATATAATTATTAACCTTGTACAGTTAGACGAA
  
```

7.1.3. ftsZ (HI1143) in *H. influenzae* Rd KW20

5' sense: 5'- **AGAATACGCTGTTGATCGTC**-3'
 5' rev: 5'- CGACGGAGCCGATTTTGAAAC **ATTATCGTACTCAGGGTACTC**-3'
 3' for: 5'- CGAGCGCCTACGAGGAATTT **TTTCTTTAATCCTGCACAGCG**-3'
 3' rev: **CTTGCACTGGAGCTACATAC**-3'

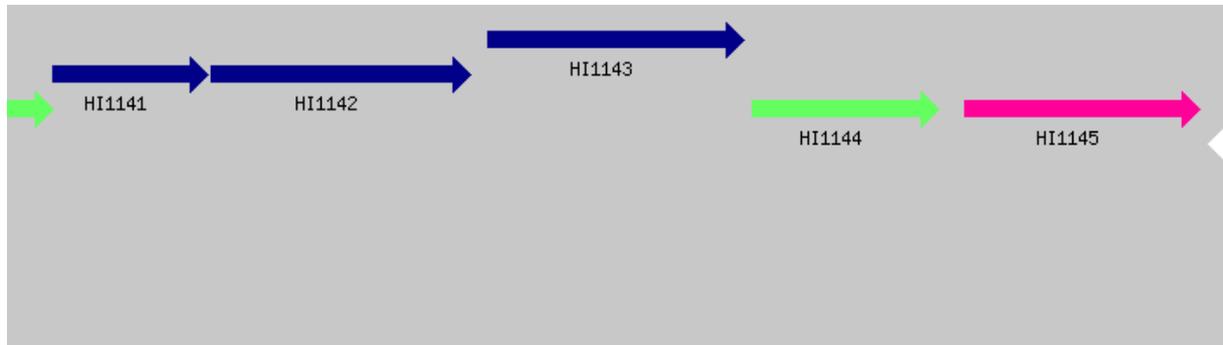


Abb. 51: Lage des ftsZ (SP1199) innerhalb des Genoms

>HI1143

```

ATGCTATACCCAGAGTACCCTGAGTACGATAATTTTAAACGAATCCGGCGCACTGATCAAAA
GTCGTAGGTGTAGGCGGTGGCGGTGGCAATGCCGTAACCATATGGTAATGAATATGGTA
AAACAAGAAATGGGCGGAACCTTTGTTGGCGAAAGTTCATTAACATCAGAGGAACACGGT
CGCATAGTATTTTATGCCGTCAATACTGATGCTCAAGCATTGCGTAAAAGTCAAGTTCAA
CAGACCGTACAAATTGGTGGAGAAAACAACCAAAGGTTTAGGTGCTGGGGCAAATCCGAAT
ATTGGTCGTAAGGCAGCTGAAGATGATCAGGATGAAATCCGCAAAATGCTTGAAGGTGCC
GATATGGTCTTTATTGCAGCAGGTATGGGCGGCGGCACAGGTACGGGTGCGGCACCTGTT
GTTGCTAAAATTGCTAAAGAACTCGGTATTTTGACTGTTGCTGTAGTACTAAACCTTTT
ACCTTTGAAGGCAAAAAACGTATGCAATTTGCAGAGCTTGGTATTAAGATTTATCCCAA
TATGTTGATTCAATGATTATTATTCCGAATCAACAAATCCAAAAAGTTCTCCCTAAAAAT
GCTAAATTAATTGATGCTTTTGCTGCTGCAAACGACGTATTGCGTAATTCTGTAATGGGA
ATTTAGATATGATTACCTCTCCTGGTTTAATTAACGTGGACTTCGCTGATGTAAGAACG
GTAATGTCAGTTC AAGGGCAAGCTATGATTGGTTTTGGTTCAGCTGTGGGAGAACCCGGT
GCAGGTAGAGCAGAAGAGGCAGCTCGTCTTGCAAGTACGCAATGATCTTCTAGAAAAATC
GATCTTTCTAACGCTCAAGGAATTTTAGTTAATATTACTGCTGGAATGGATTTAGTTTTT
GAAGAGTTTAAACATTATAGGTGAGACAATAGGTAGTTTTGCTTCTGAAGAAGCTACAGTT
GTTGTTGGTACGAGTTTAGTGCCTGAGATGAGCGATGAAATTCGTGTAAC TATTGTGGCA
ACTGGTCTCGGTGAAATTGCAGGAAATGAACCAATTCAGGTTGTTTCGTCAAGGGCTTTCT
ACGCAGAATATTGAAGGTGAAGGACGTGTAACATTTGTTTCTGAACTTCATCGTCTGTGAA
TCTGTTGAAGTGTCAAGAAGTGCATCAGAAGAATATCAACGGCCGTTAGATAAACCGATT
ACAGATCGCTTGAAGCATTTAAGAAAAATAATTTCTTTAATCCTGCACAGCGTGAAGAA
AATTAA
  
```

ftsZ Sequenz mit 1000bp Flanken und eingezeichneten Primern für Deletionskassette

>Haemophilus influenzae KW20 Rd 1211022 -1214287

TGCCAGAAGGCTTATCTTTATTGCATGTTATTCCACA **AGAATACGCTGTTGATCGTC**AGA
TGAACATTA AAAAATCCATTGGGATTACAAGGCGTGCGTTTAAAAGCACAAGTACATTTGA
TCGCTTGTGCATCAAGATTGGCAAATAACTTAAAAAAGCCGTTGAACGTTGTGGATTGC
AAGTGGATAAAGTGGTTTTCTCTGGTTTTGCAGCAACACATTCTGTGCTAACTGAGGATG
AAAAAGATCTCGGCGTGTGTTTAATTGATTTTTGGTGCTGGCACAATGAACGTGATGGTTT
ATACGAATGGCGCATTACGTTTTAGCAAGGTAATTCCTTACGCAGGAAATATTGTGACAA
ATGATATTGCGCACGCTTGTACAATTTTCGCGAGCAGAAGCAGAACGGATCAAAGTGAAC
ATGCTAGTGCATTTTACCCAGCTCGTTTTGCACGGAGATAAAAAAATTGAAGTGGCAAGTA
TTGGCGGTGCTGCGCCTCGTTTCATTAACAAAAAGTGATTTATCTTTAATTACATCAGCTC
GTTATACGGAGCTTTTAGGCGTGGTAAAAGATGAATTAGATAAGTTAAAAGCTGAATTAG
AAGCAAAACATATTA AATTTGAATTAATTGCAGGTGTGGTAATAACTGGTGGTGGAGCGC
AGATTGAAGATCCTTAAAGAATGCGCTTCAAATGTTTTCCATTGTCAGGTGCGTATTGCGA
GTCCATAAATATTACTGGTTTTGACTGATTACGTGAATCGTCCACAATATTCAACGGTGG
TGGGACTATTGCAATATAATTACAGTAATAGTGATGATGATTTAATTTTCAGGAAGTGATG
ATTCTGAAGGAACCTTTCTTTGAATCTATTTGGCAAGGAGTAAAAAAATTTGTCAATAAAG
TGCGGTGAGAATTTTGATTATTTTAATTTTTTCATCTACAATAAAGGGAATTTATATTTTA
TATATTTAGTCAGCTTATCTGGCAGTAACGGAGAACATCA

5'

ATGCTATACCCAGAGTACCCTGAGTACGATAAATTTAACGAATCCGGCGCACTGATCAAA
GTCGTAGGTGTAGGCGGTGGCGGTGGCAATGCCGTAACCATATGGTAATGAATATGGTA
AAACAAGAAATGGGCGGAACCTTTGTTGGCGAAAGTTCATTAACATCAGAGGAACACGGT
CGCATAGTATTTTATGCCGTC AATACTGATGCTCAAGCATTGCGTAAAAGTCAAGTTCAA
CAGACCGTACAAATTGGTGGAGAAACAACCAAAGGTTTAGGTGCTGGGGCAAATCCGAAT
ATTGGTCGTAAGGCAGCTGAAGATGATCAGGATGAAATCCGCAAAATGCTTGAAGGTGCC
GATATGGTCTTTATTGCAGCAGGTATGGGCGGCGGCACAGGTACGGGTGCGGCACCTGTT
GTTGCTAAAATTGCTAAAGAACTCGGTATTTTGACTGTTGCTGTAGTGAACCTTTT
ACCTTTGAAGGCAAAAAACGTATGCAATTTGCAGAGCTTGGTATTAAGATTTATCCCAA
TATGTTGATTCAATGATTATTATCCGAATCAACAAATCCAAAAAGTTCCTCCCTAAAAAT
GCTAAATTAATTGATGCTTTTGCTGCTGCAAACGACGATTTGCGTAATCTGTAATGGGA
ATTTTCAGATATGATTACCTCTCCTGGTTAATTAACTGACTTCCGCTGATGTAAGAACG
GTAATGTCAAGTCAAGGGCAAGCTATGATTTGGTTTTGGTTCAGCTGTGGGAGAACCCGGT
GCAGGTAGAGCAGAAGAGGCAGCTCGTCTTGCAAGTACGCAATGATCTTCTAGAAAAATC
GATCTTTCTAACGCTCAAGGAATTTTAGTTAATATTACTGCTGGAATGGATTTAGTTTTT
GAAGAGTTTAAACATTATAGGTGAGACAATAGGTAGTTTTGCTTCTGAAGAAGCTACAGTT
GTTGTTGGTACGAGTTTAGTGCCTGAGATGAGCGATGAAATTCGTGTAAC TATTGTGGCA
ACTGGTCTCGGTGAAATTCAGGAAATGAACCAATTCAGGTTGTTTCGTCAAGGGCTTTCT
ACGCAGAATATTGAAGGTGAAGGACGTGTAACATTTGTTCCCTGAACTTCATCGTCGTGAA
TCTGTTGAAGTGTCAAGAAGTGCATCAGAAGAATATCAACGGCCGTTAGATAAACCGATT
ACAGATCGCTTGAAGCATTTAAGAAAAATAA **TTTCTTTAATCCTGCACAGCGTGAAGAA**
AATTAA

ftsZ

TAAGTTTCAGAAAA
TACCTAGTAAATGAAGGTAGTAGAATGATTA AACAAAGAACATTA AAAACAAAGTATTTAAA
GTTACAGGCGTTGGCTTGCATAGCGGTGAAAAAGTGACATTAACCTTGCGCCCAGCTATG
CCAAACACTGGTGTGTTTATTATCGTACAGATTTAAACCTTGCGGTGGCATTCCCTGCT
GATCCTAATTCAGTGCCTGATACAATGCTTTGTACCGCACTAATTAATGAACAAGGTGTG
CGTATTTCTACCGTCGAGCATTAAATGCAGCTTTGGCAGGGCTTGGTATTGATAATATT
ATTATTGAAGTTGATGCTCCTGAAATTCCAATTATGGATGGTAGTGTAGTCCGTTTATC
TATTTGTTGTTAGATGCGGGAATTGAAGAACA AAAATGCAGCGAAAAAATTTATTTCGTATT
AAGCAATATGTTTCGAGTTGAAGATGGCGATAAATGGGCTGAATTTAAGCCTTACAATGGT
TTTTCGTTTTAGATTTTACTATTGATTTTGACCATCCTGCTATTGGCAAAGATGTACGTAAC
TATGAAATGAATTTTTCTGCCCAAGCATTGTTTCATCAAATTAGCCGAGCAAGA ACTTTTT
GGCTTTATGAAAGATATTGAATATCTTCAATCTCAAGGTTTAGTATTAGGTGGTAGCCTT
GATAATGCGATTGTTCTTGATGATTATAGAATTTTAAATGAAGATGGTTTACGTTTTAAA
GATGAACTTGTTCGTCATAAAATGTTAGATGCAATTTGGTGTCTTTATATGGCTGGTTAT
AACATTATCGGTGATTTTAAAGCCTATAAATCAGGTCACGGTTTAAATAACAAGTACTT
CGTGCTGTTTTAGCAAATCAAGAAGCGTGGGAATTTGTAACCTTTGAAGATAAAGCGCAA
GTGCCACAAGG **GTATGTAGCTCCAGTGAAG** TGCTTATTTAATTGTTTTATTGTTGAAAA
AGCTATATTTCTGGTGGGAAGTATAG

3'

7.1.4. Kanamycin Kasette

forward: 5'- **GGTTTCAAATCGGCTCCGTCG** -3'

reverse: 5'- **ACAAATTCCTCGTAGGGCGCTCG** -3'

aph(3')-III gene of type III

```
GATAAACCCA GCGAACCAATT TGAGGTGATA GGTAAGATTA TACCGAGGTA TGAAAACGAG      60
AATTGGACCT TTACAGAATT ACTCTATGAA GCGCCATATT TAAAAAGCTA CCAAGACGAA      120
GAGGATGAAG AGGATGAGGA GGCAGATTGC CTTGAATATA TTGACAATAC TGATAAGATA      180
ATATATCTTT TATATAGAAG ATATCGCCGT ATGTAAGGAT TTCAGGGGGC AAGGCATAGG      240
CAGCGCGCTT ATCAATATAT CTATAGAATG GGCAAAGCAT AAAAACTTGC ATGGACTAAT      300
GCTTGAAACC CAGGACAATA ACCTTATAGC TTGTAAATTC TATCATAATT GTGGTTCAA      360
AATCGGCTCC GTCGATACTA TGTTATAACG CAACTTTCAA AACAACTTTG AAAAAGCTGT      420
TTTCTGGTAT TTAAGGTTTT AGAATGCAAG GAACAGTGAA TTGGAGTTCG TCTTGTATA      480
ATTAGCTTCT TGGGGTATCT TTAAATACTG TAGAAAAGAG GAAGGAAATA ATAAATGGCT      540
AAAATGAGAA TATCACCGGA ATTGAAAAAA CTGATCGAAA AATACCGCTG CGTAAAAGAT      600
ACGGAAGGAA TGTCTCCTGC TAAGGTATAT AAGCTGGTGG GAGAAAATGA AAACCTATAT      660
TTAAAAATGA CGGACAGCCG GTATAAAGGG ACCACCTATG ATGTGGAACG GGAAAAGGAC      720
ATGATGCTAT GGCTGGAAGG AAAGCTGCCT GTTCCAAAGG TCCTGCACTT TGAACGGCAT      780
GATGGCTGGA GCAATCTGCT CATGAGTGAG GCCGATGGCG TCCTTTGCTC GGAAGAGTAT      840
GAAGATGAAC AAAGCCCTGA AAAGATTATC GAGCTGTATG CGGAGTGCAT CAGGCTCTTT      900
CACTCCATCG ACATATCGGA TTGTCCCTAT ACGAATAGCT TAGACAGCCG CTTAGCCGAA      960
TTGGATTACT TACTGAATAA CGATCTGGCC GATGTGGATT GCGAAAACCTG GGAAGAAGAC     1020
ACTCCATTTA AAGATCCGCG CGAGCTGTAT GATTTTTTAA AGACGGAAAA GCCCGAAGAG     1080
GAACTTGTCT TTTCCACGG CGACCTGGGA GACAGCAACA TCTTTGTGAA AGATGGCAAA     1140
GTAAGTGGCT TTATTGATCT TGGGAGAAGC GGCAGGGCGG ACAAGTGGTA TGACATTGCC     1200
TTCTGCGTCC GGTCGATCAG GGAGGATATC GGGGAAGAAC AGTATGTCTGA GCTATTTTTT     1260
GACTTACTGG GGATCAAGCC TGATTGGGAG AAAATAAAAT ATTATATTTT ACTGGATGAA     1320
TTGTTTTAGT ACCTAGATTT AGATGTCTAA AAAGCTTTAA CTACAAGCTT TTTAGACATC     1380
TAATCTTTTC TGAAGTACAT CCGCAACTGT CCATACTCTG ATGTTTTATA TCTTTTCTAA     1440
AAGTTCGCTA GATAGGGGTC CCGAGCGCCT ACGAGGAATT TGTATCGAT     1489
```

PCR Produkt für die Kanamycin-Resistenzkasette enthält zusätzlich zur *cds* die Transkriptions- und Terminationselemente.

8. Literatur

- 1: **Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ.** 1999. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA.*: 281(1):67-71.
- 2: 2005. The Top Pharmaceuticals That Changed The World. Vol. 83, Issue 25
- 3: **Walsh C.,** 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.*: 1(1):65-70.
- 4: **Walsh C.,** 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. p288-289
- 5: **Noble, W. C., Virani, Z., Cree, R.G.A.,** 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 93: 195-198
- 6: **Walsh C.,** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.*: 406(6797):775-81.
- 7: **al-Obeid, S., Collatz, E., Gutmann, L.,** 1990. Mechanism of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob Agents Chemother.*: 34(2): 252–256.
- 8: **Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J., Nakamura, S.,** 1988. Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.*: 211(1):1-7.
- 9: **Schweizer, H.P.,** 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* 2 (1): 48-62
- 10: **Mushegian, A. R., Koonin, E. V.,** 1996. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 10268-10273
- 11: **Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis. M.R., Maruf, M., Hutchison III, C.A., Hamilton O. Smith, H.O., and Venter, J.C.,** 2006. Essential genes of a minimal bacterium. *PNAS*: 103: 425-430
- 12: **Akerley BJ, Rubin EJ, Camilli A, Lampe DJ, Robertson HM, Mekalanos JJ.** 1998. Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*: 95: 8927-8932
- 13: **Gerdes, S.Y., Scholle, M.D., Campbell, J.W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M.D., Somera, A.L., Kyrpides, N.C., Anderson, I., Gelfand, M.S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M.V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M.Y., Overbeek, R., Barabasi, A.L., Oltvai, Z.N. and Osterman, A.L.:** 2003. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol*: 185: 5673-84.

- 14: Judson N., Mekalanos J.J.,** 2000: TnAraOut, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. *Nat Biotechnol*: 18: 740-745 Seite 92
- 15: Akerley BJ, Rubin EJ, Novick VL, Amaya K, Judson N, Mekalanos JJ.** 2002. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*: 99(2): 966-71.
- 16: Danner, D.B., Deich, R.A., Sisco, K.L., Smith, H.O.,** 1980: An eleven-base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Gene*: 11(3-4):311-8.
- 17: Reich, K.A., Chovan. L., and Hessler, P.,** 1999. Genome Scanning in *Haemophilus influenzae* for Identification of Essential Genes. *J. Bacteriol.*: vol. 181 no. 16 4961-4968
- 18: Zalacain M., Biswas S., Ingraham K.A., Ambrad J., Bryant A., Chalker A.F., Iordanescu S., Fan J., Fan F., Lunsford R.D., O'Dwyer K., Palmer L.M., So C., Sylvester D., Volker C., Warren P., McDevitt D., Brown J.R., Holmes D.J., Burnham M.K.R.,** 2003. A Global Approach to Identify Novel Broad-Spectrum Antibacterial Targets among Proteins of Unknown Function. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 6:109–126
- 19: Itaya, M.,** 1995. An estimation of minimal genome size required for life. *FEBS Lett.*: 10;362(3):257-60.
- 20: Chen JD, Morrison DA.,** 1988. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene.*: 64(1):155-64.
- 21: T Chakraborty, M Leimeister-Wächter, E Domann, M Hartl, W Goebel, T Nichterlein, S Notermans** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol.*: 174(2): 568–574.
- 22: Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Debarbouille M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Le Coq D, Masson A, Mauel C, Meima R, Mellado RP, Moir A, Moriya S, Nagakawa E, Nanamiya H, Nakai S, Nygaard P, Ogura M, Ohanan T, O'Reilly M, O'Rourke M, Pragai Z, Pooley HM, Rapoport G, Rawlins JP, Rivas LA, Rivolta C, Sadaie A, Sadaie Y, Sarvas M, Sato T, Saxild HH, Scanlan E, Schumann W, Seegers JF, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Simon M, Stragier P, Studer R, Takamatsu H, Tanaka T, Takeuchi M, Thomaidis HB, Vagner V, van Dijk JM, Watabe K, Wipat A, Yamamoto H, Yamamoto M, Yamamoto Y, Yamane K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H, Zuber U, Ogasawara N.,** 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*: 100(8):4678-83.

- 23: Thanassi, J.A., Hartman-Neumann, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A., Pucci, M.J.,** 2002. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*, *Nucl. Acids Res.*: 30 (14): 3152-3162.
- 24: Forsyth, R. A., Haselbeck, R. J., Ohlsen, K. L., Yamamoto, R. T., Xu, H., Trawick, J. D., Wall, D., Wang, L., Brown-Driver, V., Froelich, J. M., C., K. G., King, P., McCarthy, M., Malone, C., Misiner, B., Robbins, D., Tan, Z., Zhu, Z.-y., Carr, G., Mosca, D. A., Zamudio, C., Foulkes, J. G. and Zyskind, J. W.,** 2002. A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 43: 1387–1400.
- 25: Ji Y, Zhang B, Van SF, Horn, Warren P, Woodnutt G, Burnham MK, Rosenberg M.,** 2001. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science*: 293(5538):2266-9
- 26: Tschierske M, Mori C, Rohrer S, Ehler K, Shaw KJ, Berger-Bächi B.** 1999. Identification of three additional femAB-like open reading frames in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.*: 171(2):97-102.
- 27: Lorenz MG, Wackernagel W.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev.* 1994 Sep;58(3):563-602.
- 28: Solomon JM, Grossman AD.** 1996. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.*: 12(4):150-5.
- 29: Patterson MJ.** 1996. *Streptococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 13.
- 30: Koller, W., Mittermayer, H.** Informationen über nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz
- 31: Alloing, G., Martin, B., Granadel, C. and Claverys, J.-P.** 1998. Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Molecular Microbiology*, 29: 75–83.
- 32: Havarstein, L. S., Coonaraswamy, G. , and Morrison, D.A.** 1995. An unmodified heptapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11140-11144.
- 33: Foster T.** 1996. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 12.
- 34: Musher DM.** 1996. *Haemophilus* Species. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 30.

- 35: Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.,** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- 36: Villafane, R., Bechhofer, D.H., Narayanan, C.S., Dubnau, D.,** 1987. Replication control genes of plasmid pE194. *J Bacteriol.*: 169(10): 4822–4829.
- 37: Patel, A.H., Nowlan, P., Weavers, E.D., Foster T.,** 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect Immun.*: 55(12):3103-10.
- 38: Tang, Y., Biek, D.P., Martin, P.K., Boyer, E., Sun, D., Schmid, M.B.,** 1998. *Genetic characterization of femX, an essential S. aureus gene with homology to femAB*. *Abstr. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. C-122, 101*.
- 39: de Boer P, Crossley R, Rothfield L.,** 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature.*: 359(6392):254-6.
- 40: Lee, J.-C., George C Stewart, G.C.,** 2003. Essential nature of the mreC determinant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*: 2003, 185(15);4490-8
- 41: Kilian, M., Thomsen, B., Petersen, T.E., Bleeg, H.,** 1983. Molecular biology of haemophilus influenzae IgA1 proteases. *Molecular Immunology*, Volume 20, Issue 9, Pages 1051-1058
- 42: Andersen, C., Maier, E., Kemmer, G., Blass, J., Hilpert, A.-K., Benz, R., Reidl, J.,** 2003. Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates. *J Biol Chem.*: 278(27):24269-76. Epub 2003 Apr 14.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

II. Curriculum vitae

Name: Katja Balazs

Geburtsdatum: 20. Februar 1971

Geburtsort: Wien

Nationalität: Österreich

Ausbildung:

- 1977-1981 Volksschule Wien
- 1981-1985 AHS
- 1985-1991 HTL, technische Chemie
- Juni 1991 Matura
- ab 2000 Studium der Molekularen Biologie Universität Wien

Beruflicher Werdegang:

- Juni 1991 – Dezember 1993: Immuno AG, Abt. DNA-Technologie
- Februar 1994 – Jänner 1997: Bender & Co, Qualitätskontrolle
- Februar 1997 – Dezember 2003: Baxter AG, bakterielle Impfstoffentwicklung
- Dezember 2003 – Mai 2007: Biovertis AG, Antibiotikaentwicklung
- ab Juni 2007: AFFiRiS AG, Impfstoffentwicklung

III. Danksagungen

Ich möchte mich bei Dr. Günther Staffler für die konstruktiven Gespräche und Diskussionen bedanken. Vor allem auch für die Offenheit gegenüber neuer Ideen und das ich all meine kreativen Gedanken ausleben und experimentell umsetzen konnte.

Danke an Roberta Baron – meine Motivationshilfe schlecht hin. Wir haben es doch noch geschafft!

Ein großer Dank geht an meine Familie – vor allem an meinen Sohn Joshua, der vor Prüfungen recht wenig von seiner Mama hatte.