

**Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung
der genetischen Determinante des CAMP Faktors
(=*cbf*-Gen) der Gruppe-B-Streptokokken
(*Streptococcus agalactiae*)**

**Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation**

**vorgelegt von
Oliver Blankenstein
aus
München**

**Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Rudolf Lütticken**

**Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. Nat. Dr. med. Andreas Podbielski**

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2005

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung.....	7
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Materialien.....	8
2.1.1	Bakterien und Plasmide	8
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Nährmedien	9
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	10
2.1.4	Geräte und technische Ausstattung	12
2.2	Methoden	14
2.2.1	CAMP-Plattentest.....	14
2.2.2	Anzucht und Temperaturinduktion von E. coli mit rekombinanten pJLA-Plasmiden.	14
2.2.3	Untersuchungen zum ko-hämolytischen Verhalten von Proteinpräparationen	14
2.2.4	DNA-Präparation	16
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	18
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA	19
2.2.7	Analyse von DNA-Fragmentgrößen	19
2.2.8	Transfer von DNA auf Nylon-Folien	20
2.2.9	Ligation und Transformation von DNA.....	21
2.2.10	Synthese von Oligonukleotiden.....	22
2.2.11	Markierung von Oligonukleotiden.....	22
2.2.12	Hybridisierung mit Oligonukleotiden.....	23
2.2.13	Ermittlung von DNA-Sequenzen	25
2.2.14	Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion	26
3	Ergebnisse	31
3.1	Restriktionsanalyse von pCO63.....	31
3.2	Subklonierung in Plasmiden	31
3.3	Funktionstestung der Subklone.....	32
3.4	Sequenzierung der Subklone	32
3.5	Nachweis des CAMP-Faktor-Gens mittels degenerierter Oligonukleotiden	36
3.5.1	Festlegung von DNA-Sonden auf Grund einer bekannten Aminosäuresequenz (Pools degenerierter Primer)	36
3.6	Versuche zum Aufbau einer CAMP-Faktor-Gen (cbf-Gen) gewichteten Genombank in E. coli	38

3.7	Klonierung des <i>cbf</i>-Gens mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion	38
3.8	Analyse der rekombinanten Plasmide	41
3.8.1	Hybridisierung mit einer degenerierten Oligonukleotid Sonde	41
3.8.2	Analyse durch Bestimmung der Basensequenz	41
3.9	Klonierung und Sequenzierung des <i>cbf</i>-Gens mit Hilfe der "inverted PCR"	41
3.9.1	Sequenzierung des <i>cbf</i> -Gens.....	43
3.9.2	Analyse der <i>cbf</i> -Aminosäuren-Sequenz.....	44
3.10	Untersuchungen zum Auftreten bei anderen Gruppe B Streptokokken.....	47
3.11	Sequenzvergleich mit CAMP-negativen Gruppe B Streptokokken	48
3.12	Klonierung des <i>cbf</i>-Gens und einzelner <i>cbf</i>-Genfragmente in einen Expressionsvektor	50
3.13	Aktivitätstestung des rekombinanten <i>cbf</i>-Proteins und der <i>cbf</i>-Proteinfragmente im Ko-Hämolyse-Test	51
4	Diskussion.....	53
4.1	Analyse des Plasmids pCO63	54
4.2	Struktur des <i>cbf</i> -Gens und Eigenschaften des rekombinanten CAMP-Faktors.....	55
4.3	<i>cbf</i> -Gene in klinischen GBS-Isolaten.....	58
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis.....	61
7	Danksagung	68

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Streptokokken gehören zur Gruppe der grampositiven Bakterien, und sind Erreger verschiedener Krankheiten bei Mensch und Tier. Biochemisch sind sie als Katalase-negative, chemoorganotrophe, nicht sporenbildende Keime mit einem Temperaturoptimum von 37°C charakterisiert. Sie wurden von Lancefield mit Hilfe von Antiseren gegen Zellwandpolysaccharide in verschiedene serologische Gruppen untergliedert. Eine große humanpathogene Bedeutung unter den Streptokokken besitzen die Streptokokken der Art *Streptococcus pyogenes* (Gruppe-A-Streptokokken), welche unter anderem als Erreger der Streptokokkenangina, des Scharlachs, weiterer eitriger und nicht-eitriger Entzündungen sowie als auslösendes Agens der "Poststreptokokkenerkrankungen" (Rheumatisches Fieber, Poststreptokokken-glomerulonephritis) beim Menschen bekannt sind. Die Streptokokken der anderen serologischen Gruppen sind z.t. tierpathogene Keime, teilweise humanpathogene Opportunisten die häufig erst dann eine Bedeutung als Erreger erlangen, wenn der Wirtsorganismus über eine schwache oder geschwächte Immunabwehr verfügt.

Zu diesen fakultativ humanpathogenen Erregern zählen auch die Streptokokken der serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), welche erstmals als Erreger einer Rindermastitis (Gelber Galt) isoliert wurden. Die Erstbeschreibung als humanpathogener Keim erfolgte 1935 durch Fry als Erreger einer puerperalen Sepsis. In der Folgezeit zeigte sich die Bedeutung der Gruppe-B-Streptokokken (GBS) vor allem als Erreger von Neugeboreneninfektionen. Seit dem Beginn der 70er Jahre wurden vermehrt Fälle von Neugeborenensepsis mit GBS als Erreger beschrieben.

Die Häufigkeit dieser Infektionen mit GBS wurde nach einer Untersuchung von Boyer et al. (1983) für das Jahr 1981 mit 2 Fällen auf 1000 normalgewichtige Neugeborene und mit 20 Fällen auf 1000 Neugeborene unter 1000 g Geburtsgewicht angegeben. GBS waren damit die häufigsten Erreger einer neonatalen Sepsis in den USA. Auch im Zeitraum zwischen den Jahren 1980 und 1990 zeigten die Untersuchungen von Cochi (1983), Pyplinow (1994) und Regan (1991) eine fast unveränderte hohe Inzidenz. In den verschiedenen Untersuchungen wurde eine relativ große Streubreite der Kolonisation von Schwangeren und Neugeborenen abhängig vom Land, der Region, dem sozialen Status sowie dem Entnahmeort des Abstriches und der Nachweismethode gefunden. Baker et al. (1988) zeigten eine bis zu 50% niedrigere Detektionsrate bei der ausschließlichen Verwendung von Cervix- im Vergleich zu zusätzlich durchgeführten Anorektalabstrichen sowie bei

Auswahl ungeeigneter Selektivmedien. Die in früheren Untersuchungen stark variierenden Besiedlungsraten könnten daher auch methodisch bedingt sein. Gordons et al. und Anthony et al. (1981) fanden bei schwangeren Frauen im Urogenital- und Gastrointestinaltrakt einen Besiedlungsgrad von 5 - 40%. Diese Besiedlung wird als die Hauptquelle für Neugeboreneninfektionen angesehen. In Europa wird die Besiedlungsrate von Schwangeren mit 12 - 13,5% angegeben (de Cueto et al., 1996 und Hordnes et al., 1996). In den USA scheint die Besiedlung mit 21% etwas höher zu liegen (Regan et al., 1996), wobei neuere Untersuchungen von Hickman et al. 1999 einen weiteren Anstieg der Inzidenz auf ca. 30% bei schwangeren Frauen nachgewiesen haben. Eine Besiedlung mit GBS im zweiten Schwangerschaftstrimenon wurde von Regan et al. 1996 als Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit und Untergewichtigkeit der Neugeborenen diskutiert. Eine erhöhte Sepsisrate beim Neugeborenen (19% bei kolonisierten, 0,6% bei nicht besiedelten Frauen) war in dieser Untersuchung jedoch ausschließlich mit der Kolonisation der Mutter zum Geburtszeitpunkt korreliert.

Neben diesen Neugeborenen- und Schwangerschaftsinfektionen sind GBS als Erreger klinisch relevanter Infektionen, insbesondere bei Harnwegsinfektionen, aber auch bei Pneumonien, Endokarditiden und Hautinfektionen beschrieben worden (Blancas et al. 2003 sowie Farley 2001). Schwere GBS-Infektionen im adulten Alter stehen im Zusammenhang zu spezifischen Risikofaktoren wie hohes Alter (> 65 Jahre), Diabetes mellitus, beeinträchtigter Immunabwehr, Multimorbidität und Bettlägrigkeit (Tyrell et al. 2000). Diese schweren Verläufe bei den vorgeschädigten Patienten weisen eine hohe Mortalitätsrate (5 – 30%) auf (Bolanós et al. 2001 und Blancas et al. 2003).

Die Ursachen für die Pathogenität der GBS sind im Einzelnen ungeklärt. Die Bedeutung der Polysaccharid-Kapsel als Hauptvirulenzfaktor ist anzunehmen. Dabei ist festzustellen, dass Infektionen von Neonaten mit Kapseltyp III GBS in der Regel einen schwereren Verlauf zeigen als solche mit Kapseltyp-I oder -II B-Streptokokken. Baker und Kasper fanden 1976 im Nabelschnurblut von an GBS-Sepsis erkrankten Neugeborenen signifikant niedrigere Spiegel an spezifischen Typ III-Antikörpern, was sie als Hinweis auf die protektive Funktion dieser Antikörper werteten. Bei Abwesenheit dieser spezifischen Typ III Antikörper im Blut von Schwangeren ist daher von einem erhöhten Risiko für eine GBS-Infektion für Mutter und Kind auszugehen. Aus tierischen Quellen stammende Isolate haben häufig keine nachweisbare Kapsel, während schwere Infektionen beim Menschen überwiegend von bekapselten GBS verursacht werden. Bei den ZNS-Infektionen von immunsupprimierten Erwachsenen dagegen sind GBS des Kapseltyps-II die häufigsten Erreger. Für die Typ-III-Kapselsubstanzen konnte in verschiedenen Tiermodellen sowie an Zellkulturen mit

Humanleukozyten gezeigt werden, daß sowohl die Aktivierung des alternativen Komplementsystems als auch die Phagozytose der Erreger durch eine intakte Typ-III-Kapselstruktur gehemmt wird (Rubens, Wessels et al. 1987, Wessels, Rubens 1986). Insbesondere der Kieselsäure-Gehalt der Kapsel spielt als Virulenzfaktor eine besondere Rolle, wobei ein höherer Gehalt an Kieselsäure die Aktivierung des Komplementsystems hemmt (Edwards et al. 1982). Die Kapsel der aus invasiven Infektionen und Meningitiden isolierten Stämme enthält deutlich mehr Kieselsäure als bei klinischen Isolaten aus nicht-invasiven Infektionen. Bei aus nicht-invasiven Infektionen isolierten Stämmen ist dagegen eine hohe Aktivität an C5a-ase als Komplement-inaktivierender Mechanismus der GBS beschrieben worden (Briesacher et al. 1995). Takahashi et al. beschrieben 1995 die C5a-ase-Bildung zur Abschwächung der Immunantwort und 1999 die gegenseitige Hemmung dieser beiden Mechanismen, wobei die ausbleibende Aktivierung des Komplementsystems durch höheren Kieselsäure-Gehalt der Kapsel eine Invasion und Bakteriämie eher begünstigt als die Inaktivierung des Komplementsystems durch die C5a-ase.

Außer den Typenantigenen werden bei GBS in erster Linie von den Bakterien in ihre Umgebung abgegebene Zytotoxine als Pathogenitätsfaktoren diskutiert. Von diesen sind bis jetzt das Hämolysin sowie der CAMP-Faktor bekannt. Das Hämolysin befähigt GBS zur β -Hämolysen bei Wachstum auf Schafblutagar. Es gilt als ein verstärkender, aber nicht essentieller Virulenzfaktor bei der GBS-Sepsis (Ferrieri, 1985; Weisner und Rubens, 1987 sowie Tapsall et al. 1991). Über die Klonierung und die DNA-Sequenzanalyse des Hämolysin-Gens wurde von Lütticken (1988) und Conrads et al. (1990) berichtet. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich bei dem dort charakterisierten Gen nicht um das eigentliche Hämolysingen, sondern um ein Gen für ein regulatorisch wirksames Protein, welches in *E. coli*-Wirten die Expression latenter Hämolysine aktiviert. Das tatsächliche Hämolysingen der Gruppe-B-Streptokokken (*cyIE*) wurde 1999 von Spellerberg et al. durch Transposon-Mutagenese entdeckt und später durch Pritzlaff (2001) und Glaser (2002) bestätigt. Inwieweit für die „in vivo“ Funktion des Hämolysins (Nizet, 2002) neben dem Strukturgen (*cyIE*) weitere Gene erforderlich sind ist noch Gegenstand der aktuellen Diskussion (Spellerberg und Nizet 2003).

Im Gegensatz zum Hämolysin, welches Tiererythrozyten ohne jegliche Vorbehandlung zu zerstören vermag, handelt es sich beim CAMP-Faktor um ein Ko-Zytolysin. Die kohämolytische Wirkung der GBS wurde zuerst 1944 von Christie, Atkins und Munch-Petersen beschrieben. Die Bezeichnung CAMP-Faktor ist ein Akronym aus den Namen der Erstbeschreiber. Die durch den CAMP-Faktor bewirkte CAMP-Reaktion ist ein Phänomen, welches z.B. bei Wachstum von GBS auf Schafblutagar innerhalb der Diffusionszone des

Staphylococcus aureus β -Toxins auftritt. Dabei kommt es durch das Zusammenwirken von CAMP-Faktor und β -Toxin zu einer Hämolyse. Die CAMP-Reaktion kann auch als CAMP-Plattentest zur Identifikation von Gruppe B Streptokokken in der Routinediagnostik eingesetzt werden.

Die Erstbeschreiber erkannten als Ursache für das kohämolytische Phänomen einen extrazellulären, hitzestabilen und filtrierbaren Faktor, welcher von den Keimen in den Kulturüberstand abgegeben wird. Brown et al. beschrieben 1974 die antigenen Eigenschaften des CAMP-Faktors und die Hemmung des CAMP-Phänomens durch Antisera infizierter Tiere. Bernheimer et al. charakterisierten 1979 den CAMP-Faktor als Protein mit einem Molekulargewicht von 23.500 Dalton und einem pK-Wert von 8,3. Durch Experimente an Liposomen erklärten Bernheimer et al. den Wirkungsmechanismus als nichtenzymatische Bindungsreaktion des CAMP-Faktors an die Spaltprodukte von Sphingomyelinasen (z.B. Ceramide), durch welche die Phospholipid-Doppelmembran destabilisiert wird.

Die Arbeitsgruppe um Fehrenbach bestätigte 1984 den nichtenzymatischen Wirkungsmechanismus des CAMP-Faktors und beschrieb die Abhängigkeit der Kohämolyse von bestimmten Phospholipid/Cholesterin-Relationen. Anzeichen für einen CAMP-Faktor spezifischen Rezeptor ergaben sich nicht. Nach Fehrenbach et al. (1984) wird durch die Vorbehandlung mit Sphingomyelinasen der Zwitterionencharakter von Phospho- und Sphingolipiden an der Membranaußenseite aufgehoben, was zu einer Änderung der "Fluidität" der Doppelmembran führt. Die Interaktion von CAMP-Faktor mit diesen vorgeschädigten Membranstrukturen führt dann zu umschriebenen Defekten in der Zellmembran und damit zur Zytolyse.

In ihren Untersuchungen mit rekombinantem CAMP-Faktor konnten Lang und Palmer 2003 zeigen, dass die CAMP-Kohämolyse durch Zugabe von Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht > 6000 aufgehoben werden kann. Da dieser Effekt auf eine Bildung von transmembranären Poren schließen lässt, konnten sie anhand des „osmotischen Radius“ von PEG 6000 auf eine Porengröße von 1,6 bis 2,7 nm schließen. Da diese Poren in der Elektronenmikroskopie heterogen aussahen vermuten sie eine Bildung von CAMP-Faktor-Oligomeren als zugrundeliegenden Mechanismus. Weiter beschrieben sie eine deutlich schlechtere Kohämolyse an Liposomen. Insgesamt beeinflusste der Cholesteringehalt die CAMP-Hämolyse in Liposomen stärker als der Gehalt an Ceramiden.

Jürgens et al. beschrieben 1984 den CAMP-Faktor aus Kulturüberstand als ein Protein von 25.000 Da. mit einem isoelektrischen Punkt von 9,1, welches sich durch Bromcyan-Spaltung in zwei unterschiedlich große Fragmente von 10 kDa (N-terminales Ende) und 15

kDa (C-terminales Ende) spalten ließ. Zusätzlich zu dem 25 kDa Protein beschrieben Fehrenbach et al. 1988 noch vier weitere Formen des CAMP-Faktors im Kulturüberstand (22 – 27 kDa), die sich nur in der Länge des N-Terminus unterscheiden und die nach Bromcyan-Spaltung weitere 2 – 4 kDa große Fragmente ergeben. Jürgens et al. beschrieben 1987 eine unspezifische Bindung des CAMP-Faktors an Immunglobuline der Klassen IgG und IgM verschiedener Säugetiere. Da die spezifische Bindungsfähigkeit der Antikörper dabei erhalten blieb, folgerten sie daraus auf eine Bindung des CAMP-Faktors an den Fc-Teil von Immunglobulinen, ähnlich dem Bindungsverhalten von Protein A mit Antikörpern. Mit dem gereinigten CAMP-Faktor wurden spezifische Antiseren erzeugt die in der Lage sind die CAMP-Hämolyse zu unterdrücken. Die Inhibition durch Immunglobuline der Klasse IgM ist dabei ausgeprägter als durch solche der Klasse IgG.

Aus diesen Ergebnissen entwickelten die Autoren ein Modell des Pathomechanismus des CAMP-Faktors. In der experimentellen Prüfung dieses Modells an der Maus konnten sie beobachten, daß Infektionen mit GBS bei zusätzlicher Gabe von CAMP-Faktor einen schwereren bis letalen Verlauf nahmen als solche ohne zusätzliche Gabe von CAMP-Faktor. Die Gabe von CAMP-Faktor ohne zusätzliche Infektion mit GBS provozierte jedoch keine Krankheitszeichen, so daß der CAMP-Faktor als alleiniges Pathogen unwirksam war. Zur Erklärung dieses Effekts führten die Autoren eine Modulation der Immunantwort des Wirtes durch den CAMP-Faktor an. Im Einzelnen vermuteten sie eine Antikörper abfangende Funktion des CAMP-Faktors, die durch die verringerte Gesamtmenge an IgG-Antikörpern zu einer ineffektiveren Immunantwort führt. Mit dieser These erklärten sie auch die erhöhte Anfälligkeit der Neugeborenen, da diese überwiegend auf die begrenzte Menge an übertragenen mütterlichen IgG-Antikörpern angewiesen sind und bei Auftreten akuter bakterieller Infektionen keine ausreichenden Mengen eigener Antikörper bilden können.

Von derselben Arbeitsgruppe wurde 1988 die Aminosäuresequenz des CAMP-Faktors ermittelt. Demnach handelt es sich um ein Polypeptid aus 226 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 25.263 Da. Es enthält zwei verschiedene repetitive Sequenzbereiche in denen je 5 bzw. 11 Aminosäuren dreifach reiteriert werden. Damit unterscheidet sich der CAMP-Faktor von anderen Fc-bindenden Proteinen (Protein A, Protein G) durch die vergleichsweise geringe Anzahl der repetitiven Bereiche. Die Sequenz des CAMP-Faktors enthält keine ausgeprägt hydropophoben Bereiche, die als Ankersequenzen in Membranen dienen könnten. Untersuchungen von Rühlmann et al. 1988 an Spaltprodukten des CAMP-Faktors erbrachten Hinweise auf die Lokalisation der verschiedenen Proteinfunktionen. Demnach war der N-terminale Teil für die kozytolytische Fähigkeit zuständig, während das 13,5 kDa Spaltfragment aus der Proteinmitte die Funktionsdeterminante für die Fc-

Bindungsfähigkeiten war. Bei Sequenzvergleichen entdeckten Rühlmann et al. 1990 Homologien des N-terminalen Teils des CAMP-Faktors (AS 1-120) zu einem vermutlich lipidbindenden Teil des humanen Apolipoprotein A-IV (32%) sowie eine Homologie des C-terminalen Teils des CAMP-Faktors (AS 129-217) zu Protein A (36%). Die Homologien zum Apolipoprotein A-IV könnten zu einer ähnlichen Funktion und Sekundärstruktur, nämlich der Bildung amphiphiler Helixes, führen. Die Homologie zu Protein A könnte ebenfalls zu einer ähnlichen Funktion, der Fc-Bindung von Antikörpern, führen.

1988 berichteten Schneewind et al. über die Isolierung des CAMP-Gens (*cbf*-Gen) aus GBS und die anschließende Klonierung in Lambda-Phagen, sowie die Subklonierung in *E.coli*-Plasmide. Der aus dieser Arbeit resultierende Klon pCO63 war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

1.2 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeit war die Subklonierung des *cbf*-Gens aus dem Plasmidklon pCO63, seine Charakterisierung sowie die DNA-Sequenzanalyse. Die DNA-Sequenzdaten des *cbf*-Gens sollten den Vergleich mit den Sequenzen anderer Zytolysine und anderer Fc-bindender Proteine ermöglichen, sowie die Analyse von Promotor- und Regulationssequenzen ermöglichen. Nach erfolgter molekularer Charakterisierung waren weitere Untersuchungen, wie z.B. die Klonierung des *cbf*-Strukturgens in ein Expressionssystem, geplant, um so genauere Studien über die "in-vitro"-Wirkungsweisen des CAMP-Faktors zu ermöglichen. Mit der bekannten Sequenz sollten weitere Experimente zur gezielten Mutation des Gens sowie zur Expression von Proteinsubfragmenten ermöglicht werden, um so die Lokalisation der Funktionen innerhalb der Aminosäuresequenz zu untersuchen. Mit Hilfe des von Weber et al. 1990 entwickelten monoklonalen Antikörpers gegen CAMP-Faktor sollten dann auch Untersuchungen über die antigenen Eigenschaften der verschiedenen Bereiche des CAMP-Faktors durchgeführt werden.

Das Plasmid pCO63, welches aus der Arbeit von Schneewind (1988) resultiert, trägt ein 3,6 kB großes rekombinantes DNA-Fragment. Das Genprodukt dieses Inserts zeigte in der SDS-PAGE eine Molekülgröße von 27 - 30 kDa und reagierte im Immunoblot mit polyklonalem Anti-CAMP-Serum von Kaninchen. Dieser Subklon war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Nachdem im Verlauf der Arbeiten die Lokalisation des *cbf*-Gens auf dem Plasmid pCO63 ausgeschlossen werden konnte, wurde die Aufgabenstellung auf die Isolierung und Sequenzierung des CAMP-Gens aus chromosomaler GBS-DNA hin geändert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterien und Plasmide

Name	Eigenschaften, Referenz	Quelle
Bakterien:		
<i>E.coli</i> DH5 α	Transformations-Rezipient, Klonierungswirt mit lacZ α -Komplementierung (Hanahan et al., 1983)	1
<i>E. coli</i> JM103	Wirtsstamm für pCO62 u.pCO63 (Messing et al., 1985)	1
<i>E.coli</i> 294 (ATTC 25922)	Referenzstamm zur Antibiotikatestung	2
<i>Staph. aureus</i> ATTC 6538	β -Toxin bildender Stamm	2
<i>S. agalactiae</i> R268	CAMP-pos., Haemolysin-neg. Streptococcus der serol. Gruppe B, Serotyp III/R	1
<i>S. agalactiae</i> 74-360	CAMP-neg., Haemolysin-pos. Streptococcus der serol. Gruppe B, Serotyp III	1
<i>S. agalactiae</i> DSM 2134	Referenzstamm, CAMP-pos., Haemolysin-pos., serol. Gruppe B, Serotyp III	3
Plasmide		
pHSG575 pHSG576	low-copy-number Plasmide, lacZ α -Kompl., Chloramphenicolresistenz (Takeshita et al., 1987)	1
pBGS 18 pBGS 19	high-copy-number Plasmide, lacZ α -Kompl., Kanamycinresistenz, (Spratt et al., 1986)	4
pUC 18 pUC 19	high-copy-number Plasmid, lacZ α -Kompl., Ampicillinresistenz (Yanisch-Peron et al., 1985)	5
pCO63	pHSG575-Plasmid mit 3,6 kB Insert (Schneewind, 1988)	1

Bezugsquellen:

- 1 = Prof. Lütticken, Institut für Medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen
- 2 = ATTC, Rockville (USA)
- 3 = DSMZ, Braunschweig
- 4 = Prof. Dr. Dr. Podbielski, Medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock
- 5 = Merck AG, Darmstadt

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Nährmedien**2.1.2.1 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden bezogen von: Amersham, Braunschweig; Beckmann, Düsseldorf; Behring-Werke, Marburg; C. Roth GmbH, Karlsruhe; Marine Colloids, USA; Merck AG, Darmstadt; Pharmacia, Freiburg; Sigma Corp., München.

Die Quellen für Antibiotika waren Boehringer Ingelheim (Chloramphenicol) und Grünenthal GmbH, Stolberg (Ampicillin).

2.1.2.2 Enzyme:

Firma	Enzyme
Boehringer Mannheim	Alle Restriktionsenzyme, T4-Polynukleotid-Kinase, Alkalische Phosphatase
Gibco-BRL, Gaithersburg (USA)	T4-Ligase, <i>Taq</i> -Polymerase
Cetus Corp., Berkeley (USA)	<i>Taq</i> -Polymerase
Pharmacia, Freiburg	T7-DNA-Polymerase
Sigma Corp., München	Lysozym, RNase

2.1.2.3 Nährmedien:

Flüssigmedien:	Rezept / Hersteller
LB-Medium (Luria-Broth)	15g tryptisches Pepton (2), 5g Hefeextrakt (2) 5g NaCl; ad 1l mit Aqua dest., pH 7,4.
TPY-Bouillon	30g trypt. Pepton (2), 10g Hefeextrakt (2); ad 1l mit Aqua dest., pH 7,2.
Todd-Hewitt-Bouillon	Fertignährmedium (Oxoid CM 189).
CASO-Bouillon	Fertignährmedium (Merck 5459)

Festnährmedien:	Hersteller / Rezeptur
D.S.T.-Agar	Fertignährmedium (Oxoid CM 261).
H-Weichagar	10g Bacto-Trypton (2), 8g NaCl, 12g Bacto-Agar (2); ad 1l mit Aq.dest. (Wurde bei Bedarf mit IPTG (0,1M) und x-Gal (2%) versetzt).
Schafblutagar	Fertignährboden (Oxoid CM 55) mit 3g Hefeextrakt (2), 1g Na-Phosphat, 0,5g Na-Acetat je Ltr. Aq.dest.

Bezugsquellen für Nährmedien:

Oxoid = Oxoid Life Technology, Basingstoke (GB)

2 = Difco, Detroit (USA)

Den Nährmedien wurden zur Selektion auf Antibiotika-resistente Bakterien Ampicillin (50 mg/l) oder Chloramphenicol (25 mg/l) zugesetzt.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen nach den Vorschriften von Sambrook et al. (1989) angesetzt.

Spezielle Puffer und Lösungen	Rezeptur
CAMP-Hämolysepuffer:	10 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl
CAMP-Hämolysepuffer mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF):	10 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, 40 mg/ml PMSF
TENS:	10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS, 1 N NaOH ad pH 8,0;
TENS-Puffer:	10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 N NaOH, 0,5 % SDS.
Blocking Solution:	30 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0.3% Tween 20 mit 0,3 g Magermilchpulver/ml.
Birnboim-Acetat::	29,4 ml Kaliumacetat (29,4 %), 5 ml einer 90%-igen Ameisensäure (5 %), Aqua bidest ad 100 ml.
TE-Puffer:	10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA

Spezielle Puffer und Lösungen (Fortsetzung)	Rezeptur
Lysozymlösung:	0,3 M Glukose, 25 mM Tris pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 kleine Spatelspitze Bromkresolgrün/100 ml, vor Gebrauch Zugabe von 2-4 mg Lysozym/ml
NaOH/SDS-Lösung:	0,2 N NaOH, 1 % SDS
Kirby-Mix:	50 % neutrales Phenol 48 % Chloroform 2 % Isoamylalkohol
Lösung 1 (Colony blotting):	0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl
Lösung 2 (Colony blotting):	0,5 M Tris pH 7,5, 1,5 M NaCl
Lösung 3 (Colony blotting):	1 x SSC 10mM Magnesiumchlorid 0,5 mg Proteinase K / ml
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl einstellen
Prähybridisierungslösung:	6 x SSC 5 x Denhardt-Lösung 0,5% SDS 1 mg frisch denaturierte Salmon Sperm DNA/ml
50 x Denhardts-Lösung:	1% Ficoll 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA (Fraktion V)
Boehringer Puffer I:	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl ph 7,5 mit NaOH einstellen
Boehringer Puffer II:	Blocking-Vorratslösung 1:10 in Puffer I verdünnen
Blocking-Vorratslösung:	10 g Blocking Reagenz 100 ml Bohringer Puffer I lösen und bei 121°C autoklavieren

Spezielle Puffer und Lösungen (Fortsetzung)	Rezeptur
Boehringer Puffer III:	0,1 M Tris HCl 0,1 M NaCl 0,05 M Magnesiumchlorid pH 9,5 mit NaOH einstellen
Boehringer Waschpuffer:	3 ml Tween 20 1 l Bohringer Puffer I
AMPPD-Gebrauchslösung:	1 ml AMPPD 99 ml Bohringer Puffer III

2.1.4 Geräte und technische Ausstattung

Firma	Gerät
Beckmann, München:	Ultrazentrifuge TL-100, DNA-Synthesizer 200 A
Biometra, Göttingen:	Hybaid Hybridisierungsöfen, PCR Trio-Heizblock
Biorad, Hercules (USA):	Stromgeber für Elektrophorese Modell 3000 XI, UV-Crosslinker
Gibco BRL, Gaithersburg (USA):	Dot Blot Apparatur
cti, Idstein:	Consort-Stromgeber für die Elektrophorese Modelle E-443 und E-752; Horizontalelektrophoresekammern, Glasplatten, Haifischzahnkämme
Du Pont, Bad Homburg:	Sorvall RC 28S-Zentrifuge, Rotoren
Heidolph, Kehlheim:	Reax 2000 Schüttler
Heraeus, Hanau:	Biofuge A, Sterilisationsschrank, Varifuge K
Pharmacia-LKB, Freiburg:	Photometer Ultrospec 4050, UV-Transilluminator
Bachofer, Reutlingen :	Speedvac UVC 150 H mit Christ Kühlfalle und Brand Vakuumpumpe
Zeiss, Oberkochen:	Abbe Refraktometer

2.1.4.1 Computer und Software

Die Analyse der gewonnenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Programmpaketes PCGENE der Firma Genofit SA, Genf, auf einem HP-Vectra QS/165 Personal Computer der Firma Hewlett Packard.

Die Analyse von Nukleinsäuren- und Peptidsequenzen sowie die Umsetzung von DNA- in Peptidsequenzen erfolgte mit Hilfe der Unterprogramme des PCGENE-Pakets. Bei der

Analyse von DNA-Sequenzen auf Homologien zur bekannten CAMP-Proteinsequenz wurden auf beiden Einzelsträngen die Peptidsequenzen aus allen drei Leserastern generiert und alle kodierenden Abschnitte mit einer Länge von 10 Aminosäuren oder mehr mit der bekannten Sequenz verglichen.

2.2 Methoden

2.2.1 CAMP-Plattentest

Die zu untersuchenden Keime wurden im rechten Winkel zum β -Toxin bildenden *S.aureus* (ATCC 6538) auf Schafblutagar ausgestrichen. Die Untersuchung auf CAMP-Aktivität erfolgt nach 20 und nach 48 Std. Bebrütung bei 37 °C in 5% CO₂.

2.2.2 Anzucht und Temperaturinduktion von *E. coli* mit rekombinanten pJLA-Plasmiden.

Zur Expressionsklonierung des rekombinanten *cbf*-Gens setzten wir das Expressionssystem pJLA602 ein. Dieser Vektor ist mit einer *E. coli atpE*-Translationsstartregion ausgestattet, die unter Kontrolle des Bakteriophagen λ -Promoters- p_L , sowie des temperatursensitiven Repressors c_L steht. Dieser temperatursensitive Repressor unterdrückt die Translation fast komplett bei Temperaturen zwischen 28°C und 30°C. Bei Temperaturen oberhalb 38 - 40°C wird der Promoter freigegeben und die Translation wird maximal induziert. Gemeinsam mit der eingebauten Polylinker-Sequenz und den darin enthaltenen Stop-Kodons im entsprechenden Leseraster ermöglicht dieser Aufbau die gezielte Expression von Proteinen, was insbesondere bei toxischen oder wachstumshemmenden Proteinen von Vorteil ist.

Die Amplifikation der zu untersuchenden Genfragmente, die Ligation der rekombinanten Fragmente mit dem Vektor sowie die Transformation der DH5 α -Wirtsbakterien mit den rekombinanten Plasmiden erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.9. beschrieben. Die Anzucht der transformierten *E. coli*-Wirtsbakterien erfolgte in CASO-Bouillon mit 50 mg/l Ampicillin-Zusatz bei 30°C bis zu einer optischen Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) von 0,7. Nach Erreichen dieser Keimdichte wurden die Keime für weitere 2 - 3 Stunden im Wasserbad bei 40°C inkubiert und dadurch der Promoter und die Genexpression freigegeben. Je nach rekombinantem Fragment erreichten die Kulturen eine OD₅₅₀ zwischen 1,0 und 1,3. Die so gewonnenen Zellen wurden 1 x gewaschen, bei 8.000*g über 10 min abzentrifugiert und nach dem unten beschriebenen Sonifikations-Protokoll lysiert.

2.2.3 Untersuchungen zum ko-hämolytischen Verhalten von Proteinpräparationen

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zum CAMP-Phänomen in der Mikrotiterplatte und zur immunologischen Testung der gewonnenen *E. coli*-Klone wurden mit ungereinigten Bakterien-Sonifikaten sowie mit Kulturüberstandsproteinen durchgeführt.

2.2.3.1 Herstellung von *E.coli*-Zellysaten

Die Proteinisolierung aus *E. coli* wurde zum Aktivitätsnachweis und der immunologischen Analyse von nicht in den Kulturüberstand sezernierten Proteinen eingesetzt; insbesondere sollten plasmidkodierte Proteine, welche normalerweise im Zellinneren verbleiben, untersucht werden. Um eine Proteinkontamination mit Nährmediumsproteinen weitgehend zu vermeiden, wurden keine Flüssigkulturen verwendet.

Durchführung:

- Wachstum der Keime 18 bis 24 h auf der Kulturplatte, ggf. mit entsprechendem Selektionsantibiotikum.
- Abwaschen der Platten mit 5 ml PBS-Puffer, zweimaliges Waschen und zentrifugieren (Varifuge/3500*g/5 min.) der Keime in PBS, zuletzt aufnehmen in PBS-Puffer mit 40 mg PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)/ml als Proteaseninhibitor.
- Die Keimsuspension sollte eine Extinktion bei 550 nm von größer 0,7 haben. Die eingestellte Keimsuspension im Glas- oder Metallröhrchen wurde, bei Kühlung im Eisbad, 1 min. bei voller Leistung mit der Ultraschallsonde beschallt. Die Lösung sollte danach opaleszent erscheinen.
- Abzentrifugieren der nicht zerstörten Keime (Varifuge/3500*g/5 min.)
- Sterilfiltration des Überstandes durch Millex GS Sterilfilter (Millipore, Porenweite: 0.22 µm). Die sterilfiltrierten Sonikate konnten im Kühlschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden.
- Der Proteingehalt der Sonikate wurde mit dem BCA-Proteinassay (Pierce Chem. Comp. 23225) nach Vorschrift des Herstellers ermittelt. Der Gesamtproteingehalt der Sonikate lag zwischen 0,5 mg/ml und 4 mg/ml.

2.2.3.2 Proteinisolierung aus Kulturüberständen

Proteine, deren Auftreten im Kulturüberstand bereits beschrieben wurde, wurden aus 500 ml Übernachtkulturen isoliert. Die Anzucht von *S. agalactiae* erfolgte in TPY-Bouillon, diejenige von *S. aureus* in Caso-Bouillon.

- Abzentrifugieren der Keime (Sorvall RC268/4225*g/25 min.)
- Die Überstände wurden bis zu einem Sättigungsgrad von 75% mit Ammoniumsulfat versetzt und über Nacht zum Fällern bei 4°C inkubiert.
- Abzentrifugieren des gefällten Proteins (Sorvall RC 268 /13500*g/20 min), das Proteinpellet wurde in 100 µl 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen.
- Lösung in Dialyseschläuche füllen (Porenausschlußgröße 3500 Da) und über 2-3 Tage in 10-20 l Dialysepuffer unter Rühren dialysieren.

- Das Dialysat wurde anschließend lyophilisiert und bei einer Temperatur von -70 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 Blutplatten-Gegendiffusionstest

In Schafblutplatten wurde zentral eine Rinne (3 mm breit) und im Abstand von 0,5 cm davon jeweils 3 Löcher (Durchmesser 8 mm) ausgestanzt. Die zentrale Rinne wurde mit einer Präparation von β -Toxin gefüllt. In die Probenlöcher wurden eine Präparation von CAMP-Faktor als Positivkontrolle sowie Proteinpräparationen vermutlicher CAMP-Klone eingefüllt.

Nach 3 Std. Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Untersuchung auf Kohämolyse.

2.2.3.4 Untersuchung auf Kohämolyse im Reagenzglas

Defibrinierte Schafserythrozyten wurden nach dreimaligen Waschen in 0,9% NaCl in CAMP-Hämolysepuffer aufgenommen und zu einer 1% Schafserythrozytensuspension verdünnt. 0,5 ml des zu testenden Sonikates, respektive 0,5 ml *S.agalactiae* Kulturüberstand als Positivkontrolle, wurden mit 0,5 ml der eingestellten Schafserythrozytenlösung gemischt und jeweils 50 μ l β -Toxinpräparation zugegeben. Nach 1 Std. Inkubation bei 37 °C wurde das Hämolyseverhalten qualitativ beurteilt.

2.2.4 DNA-Präparation

Die zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendeten Verfahren beruhen alle auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Der Vorteil dieser Methoden besteht in der frühzeitigen Fällung und damit Abtrennung der chromosomalen DNA.

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken verwendeten wir ein modifiziertes Verfahren nach Huang et al. (1989).

Die Methodik bei der Plasmid-Präparation ist abhängig von der eingesetzten Keimmenge; um DNA im größeren Maßstab zu gewinnen, wurde ein modifiziertes Verfahren nach Birnboim (1983) eingesetzt ("Maxipräparation"). Aus kleineren Keimengen wurde die DNA im Einzschritt-Lyse-Verfahren nach Zhou et al.(1990) gewonnen.

2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Als Ausgangsmaterial bei der Plasmidpräparation dienten über Nacht bei 37°C bebrütete D.S.T. Platten mit Antibiotikazusatz. Die Platten wurden am Abend vorher frisch beimpft.

Minipräparation:

Ca. eine halbe 10 µl Einmalöse voll Keim-Material wurde von der Platte genommen, in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und 2 min. in der Biofuge A bei 4000 U/min (1413*g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in der verbleibenden Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl TENS zugegeben und auf dem Schüttler während 2-5 Sekunden gut durchmischt. Nach Zugabe von 150 µl Birnboim-Acetat wurde erneut für 2-5 Sekunden gemischt. Die dann ausgefallene chromosomale DNA, die denaturierten Proteine und die Zellwandbestandteile wurden anschließend in der Biofuge A für 2 min. bei 13000 U/min (14926*g) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die DNA durch Zugabe von 900 µl eiskalten Äthanol (96%) gefällt und durch Zentrifugation in der Biofuge A für 2 min. bei 13000 U/min (14962*g) abzentrifugiert. Der Alkoholüberstand wurde vorsichtig abdekantiert und das Pellet in 20 - 40 µl TE-Puffer gelöst.

Maxipräparation:

Von mehreren gut bewachsenen Platten wurden die Keime mit 10 - 20 ml physiologischer Kochsalzlösung abgespült und anschließend in der Varifuge bei 4000 U/min (2500*g) für 15 min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Lysozymlösung je eingesetzte Platte suspendiert und für 10 min. bei 0°C inkubiert. Anschließend erfolgt die alkalische Lyse durch Zugabe des zweifachen Volumens (der Lysozymlösung) an NaOH/SDS-Lösung und danach die Neutralisation mit dem 1,5fachen Volumen Birnboim-Acetat. Das Gemisch wurde weitere 10 min. auf Eis inkubiert.

Nach der folgenden Zentrifugation in der Varifuge für 15 min. bei 6000 U/min (5530*g) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und durch 2 - 3malige Phenolextraktion mit Kirby-Mix von noch gelösten Proteinen und Zellwandbestandteilen gereinigt. Um die Phenolreste zu entfernen, wurde der Überstand anschließend mit 1/4 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgehoben und mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt. Es folgt die Präzipitation der DNA für 30 min. bei -20°C. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 6000 U/min (5530*g) pelletiert, das Pellet wurde mit 70% Äthanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 400-500 µl TE-Puffer aufgenommen. Um RNA zu entfernen wurde der Lösung 20 µl RNase zugegeben und weitere 15 min. bei 37°C inkubiert.

Isolierungen zur DNA-Sequenzierung wurden anschließend über einen CsCl-Dichtegradienten (Refraktionsindex 1,3905; Zentrifugation bei 360.000*g über 3 Stunden) weiter gereinigt und die intakte Plasmid-DNA (ccc-Form) von den Formen mit Strangbrüchen sowie von den Resten chromosomaler DNA durch gezieltes Abziehen unter UV-Licht getrennt.

2.2.4.2 Präparation chromosomaler DNA aus Streptokokken

Die Präparation chromosomaler DNA aus Streptokokken erfolgte nach dem Protokoll von Huang et al. (1989). Die Methode basiert auf einer kombinierten Mutanolysin/Lysozym-Lyse der Bakterienzellwand, Proteasebehandlung und der Zellzerstörung durch SDS.

Die Keime wurden über Nacht in 10 ml THB bei 37°C inkubiert, anschließend wurden 20 ml vorgewärmten Nährmediums (THB) zugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Glycin bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % wurde erneut für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Keime wurden in der Varifuge bei 6000 U/min (5530*g) für 10 min. abzentrifugiert, in 2 ml Lysis-Lösung resuspendiert und für weitere 2 Stunden bei 37°C auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K bis zu einer Konzentration von 100 mg/ml wurde erneut für 30 min. auf dem Schwenktisch bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 40 ml einer 20 %igen SDS-Lösung zerstört was sich durch eine Klärung der vorher trüben Lösung anzeigt. Hierfür wurden die Ansätze erneut für 15 min. bei 37°C inkubiert.

Nach Zerstörung der Zellwände erfolgte die Entfernung der Nicht-DNA-Bestandteile durch mehrfaches Phenolisieren und anschließende Entfernung der Phenolreste mit Chloroform/Isoamylalkohol. Die anschließende Fällung erfolgt mit -20°C kaltem Äthanol für 20 min. im Eisfach. In der Regel wurde direkt nach Zugabe des Propanols ein DNA-Knäuel sichtbar, welches aus der Lösung herausgefischt, in 70%igem Äthanol gewaschen wurde und in 100 - 200 µl TE-Puffer vorsichtig gelöst wurde. Zur Entfernung der RNA schloß sich ein RNase-Verdau mit 100 mg RNase/ml an. 10-20 µl dieser Lösung reichten für einen Nachweis mittels Southern-Blot oder zur Auftrennung auf einem Agarosegel aus. Die Aufbewahrung der DNA-Lösung erfolgte, um kältebedingte Strangbrüche zu vermeiden bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer wäßrigen DNA- oder RNA-Lösung kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Eine OD-Einheit entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 55 mg/ml bei doppelsträngiger DNA, 45 mg/ml bei einzelsträngiger DNA und 20 mg/ml bei Oligonukleotiden (Maniatis et al., 1989).

Um den Reinheitsgrad von DNA- und RNA- Lösungen zu bestimmen, wurde der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} ermittelt. Für DNA-Lösungen sollte der Wert 1,8-2,0 betragen. Liegt der Wert darüber, ist die Lösung mit RNA verunreinigt, liegt er darunter, so weist dies auf Phenol- oder Proteinverunreinigungen hin.

2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Die vom Hersteller empfohlenen 10fach-Puffer wurden in den empfohlenen Volumina bei Verdauungsreaktionen mit nur einem Restriktionsenzym verwendet. Bei gleichzeitiger Verwendung von 2 oder 3 Enzymen wurde der günstigste gemeinsame Reaktionspuffer aus dem "Sure-Cut"-Puffersystem der Fa. Boehringer, Mannheim ermittelt und die Reaktion in diesem durchgeführt.

Die Menge an eingesetztem Restriktionsenzym richtete sich nach der Menge an zu verdauender DNA, sowie nach der Zahl der vorhandenen Schnittstellen. In der Regel wurden mit 5 Units Enzym/1 µg DNA gute Ergebnisse erzielt. Um Restriktionsenzyme einzusparen, kamen auch verlängerte Inkubationszeiten (bis 10 h), sowie fraktionierte Zugabe von Enzymen zum Einsatz.

Bei der Kombination von Enzymen, welche auf Grund der Anforderungen an pH und Salzkonzentration keine ausreichende Aktivität im gemeinsamen Ansatz entwickeln würden, erfolgte zuerst die Reaktion derjenigen Enzyme, die im Puffer mit der niedrigeren Salzkonzentration optimal aktiv sind. Salze und Enzym wurden danach durch eine Behandlung mit Kirby-Mix, Chloroform/Isoamylalkohol und Fällung der DNA mit Isopropanol oder Alkohol extrahiert.

Die zweite Reaktion, mit den Enzymen deren Reaktionsoptimum höhere Salzkonzentrationen erforderte, erfolgte dann nach dem oben beschriebenen Ansatz im Anschluß an die Resuspension der DNA in TE-Puffer unter den jeweils optimierten Bedingungen.

2.2.7 Analyse von DNA-Fragmentgrößen

Zur Fragmentgrößen-Analyse wurde die DNA in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente. Höherprozentige Gele (1-2%) wurden für die Auftrennung kleiner Fragmentgrößen zwischen 150 und 800 bp und niederprozentige Gele (0,5-1%) für Fragmentgrößen zwischen 1.000 und 12.000 bp eingesetzt. Bei der reinen Größenanalyse wurde zur Gelherstellung Normalagarose verwendet; sollten bestimmte Fragmente zur weiteren Bearbeitung aus dem Gel zurückgewonnen werden, kam "low-melting-point"-Agarose zum Einsatz. Die Analyse erfolgte auf zwei Gelgrößen:

1. Minigel: Leiterquerschnitt 3 cm², Laufstrecke 7 cm
Gesamtspannung ca. 100 V x h
2. Macrogel: Leiterquerschnitt 7,5 cm², Laufstrecke 20 cm
Gesamtspannung ca. 700 V x h

Als Laufpuffer wurde 1xTPE verwendet, der weitere Versuchsaufbau sowie die Rückgewinnung von DNA aus "low-melting-point"-Agarosegelen erfolgt wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben. Als Längenstandards diente *Hind*III verdaute λ -DNA sowie *Hae*III verdaute Φ X174-DNA.

2.2.7.1 Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

Die zu gewinnenden DNA-Banden wurden im ethidiumbromidgefärbten Gel unter UV-Licht (254 nm) ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zusammen mit 0,5 bis 1 ml 0,1x TPE in Dialyseschläuche (Porengröße 3500 Da., Fa. Röhm Chemie) eingeknotet und 45 min. bis 1 Std. bei einer Spannung von 100 V in 1xTPE elektroeluiert.

Die Flüssigkeit wurde abgezogen und zur weiteren Reinigung über eine Affinitätschromatographische Säule gegeben. Als Säulenmaterial kam NACS-52 der Fa. Gibco-BRL zum Einsatz. Die so gereinigte DNA wurde zum Restriktionsverdau und zur weiteren Einklonierung verwendet.

2.2.8 Transfer von DNA auf Nylon-Folien

Zur Identifizierung rekombinanter Plasmid-DNA und zur Detektion spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe von DNA-Sonden können verschiedene Techniken zur Fixierung der Ziel-DNA an Nylon-Trägermembranen angewandt werden. Man unterscheidet zwischen einem Blot, bei dem bereits gereinigte und aufgetrennte Nukleinsäuren auf eine Membran transferiert werden (Southern Blot) und der Übertragung der gesamten DNA einer rekombinanten Bakterienkolonie durch Kultur, Lyse und Fixierung auf der Membran (Kolonie-Blot).

2.2.8.1 Southern Blot

Der DNA-Transfer aus Agarosegelen auf Nylon Folien (Biodyne B, Fa. Pall, Dreieich) erfolgte als Diffusionsblot nach der Vorschrift von Sambrook et al. (1989). Des Weiteren wurde eine Vakuumbloßapparatur der Firma Biometra, Göttingen mit einer Vakuumpumpe der Fa. Hybaid, Teddington (UK) eingesetzt. Als Transferpuffer diente 25 mM Natriumhydrogenphosphat pH 6,5.

Nach dem Transfer wurde unter UV-Transillumination überprüft, ob alle mit Ethidiumbromid gefärbten Banden aus dem Gel auf die Trägermembran gelangt sind.

Anschließend wurde die transferierte DNA durch Backen bei 80°C oder durch Bestrahlen unter UV-Licht fixiert.

2.2.8.2 Kolonie Blot für *E. coli*

Die erfolgreiche Übertragung von rekombinanter DNA in *E. coli* kann auch, insbesondere bei der Analyse größerer Zahlen von vermuteten Rekombinanten, durch die Kolonie-Blot-Technik erfolgen.

Hierbei wurde eine Nylonmembran (Fa. Pall, Dreieich) auf Petrischalengröße zugeschnitten, sterilisiert und luftblasenfrei auf D.S.T.-Selektivagar (mit Antibiotikazusatz) gelegt. Die Keime wurden direkt mit sterilen Zahnstochern oder Stichösen auf die Membran geimpft. Parallel wurde eine "Masterplatte" mit dem identischen Impfmuster versehen, um die Keime später identifizieren und weiterverarbeiten zu können. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C aerob bebrütet.

Die mit Einzelkolonien bewachsene Nylonmembran wurde von der Platte abgenommen und zur Orientierung markiert.

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf 2-3 Lagen feuchten Filterpapiers, um ein Überspülen und damit einen möglichen Keim- und DNA-Transfer auf der mit Kolonien bewachsenen Blotoberfläche zu verhindern. Die Membran sollte dabei nur durch Feuchtigkeit von unten benetzt werden.

Vorgehen:

Zuerst Inkubation mit Lösung 1 in heißem Wasserdampf für 10 min, anschließend wurde der Blot für 10 min. bei Raumtemperatur auf Lösung 2 und für 5 min. auf 2 x SSC gelegt. Zur Entfernung der zellulären Proteine schloß sich ein Proteinase K Schritt auf Lösung 3 für 1 Std. bei 37°C an. Schließlich wurde der Blot zweimal für 1 min. auf 2 x SSC gewaschen und für 15 min. bei 120°C gebacken um die DNA auf der Membran zu fixieren.

2.2.9 Ligation und Transformation von DNA

2.2.9.1 Ligation von DNA

Die Ligationsreaktionen fanden in dem von den Herstellern (BRL, Boehringer) empfohlenem Puffersystem statt. Sie wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (King, Blakesly; 1986). Ein Standard-Ligationsansatz bestand aus:

- 100-500 ng Vektor-DNA
- zwei- bis dreifachmolare Menge Insert-DNA
- 2 Units T4-DNA Ligase
- entsprechendes Volumen 5x (10x) -Ligationspuffer

Das Volumen der Ligationsansätze wurde immer unter 20 µl gehalten. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz mit dem 5-fachen Volumen Kulturmedium verdünnt; 1/5 des

verdünnten Ansatzes wurden je 200 µl kompetente Zellen zugesetzt. Bei der Ligation mit nur einem Restriktionsenzym geschnittener DNA-Fragmente wurde der Vektor vorher mit Hilfe von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Seeburg et al. 1977; Ullrich et al., 1977), um die vektor-interne Religationshäufigkeit zu senken.

2.2.9.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die verwendeten kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen wurden nach der RbCl/CaCl-Methode von Hanahan (1983) hergestellt, in Aliquots von 200 µl abgefüllt und bis zu einem Monat verwendet. Die Transformationsreaktion erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll von Hanahan (1983). Selektiert wurde mit Hilfe entsprechender Antibiotikabeigaben sowie über den blau/weiß Selektionsmechanismus der lacZ α -Komplementierung (pUC-Plasmide) mit x-Gal und ITPG.

2.2.10 Synthese von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotid-Synthesen erfolgten nach dem Cyanoethyl-Phosphoramidit-Verfahren nach der Festphasemethodik auf Säulen mit einem Beckmann DNA-Synthesizer mit entsprechender Beckmann-Software. Die Chemikalien zur DNA-Synthese wurden von den Firmen Beckmann, München und Merck, Darmstadt bezogen.

Die Oligonukleotide müssen nach der Synthese von der Festphase abgetrennt und von den Schutzgruppen befreit werden. Dies geschieht durch 3maliges Waschen für je 15 min. mit je 0,5 ml 32%-igem Ammoniak. Durch Inkubation des Eluates über Nacht bei 55°C erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppen. Die Lösung wurde kurz auf 0°C abgekühlt, in mehrere Eppendorfgefäße portioniert und in der Speedvac eingedampft.

Die Pellets wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl Aqua bidest aufgenommen und durch eine Passage über eine Sephadex G50 Säule von Salzen und sonstigen Chemikalienresten befreit. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 10 Tropfen aufgefangen und in einer Verdünnung von 1:200 photometrisch bei 260 nm vermessen. Die Fraktion vor dem Absorptionsmaximum wurde in der Regel weiter verwendet.

2.2.11 Markierung von Oligonukleotiden

2.2.11.1 Markierung mit Digoxigenin dUTP

Die Oligonukleotide wurden an ihrem 3'-Ende durch eine terminale Desoxynukleotidyltransferase mit Digoxigenin markiert.

Markierungsansatz:

- 1 µl einer 5mM Oligonukleotidlösung
- 2,5 µl Digoxigenin dUTP
- 2,5 µl 10 x "tailing buffer"

- 20 U terminale Transferase
- ad 25 µl Aqua bidest

Der Ansatz wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und kann dann direkt in einem Hybridisierungsansatz verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Zur Markierung von größeren PCR-Produkten als Sonden wurde Digoxigenin dUTP direkt in die PCR-Reaktion zugegeben und von der *Taq*-Polymerase in das PCR-Produkt inkorporiert. Die Digoxigenin dUTP-Konzentration im PCR-Ansatz wurde auf 500 nmol/l eingestellt.

2.2.11.2 Markierung mit ^{32}P -ATP

Die Markierung der Oligonukleotide mit α - ^{32}P -NTP mit T4-Polynucleotidkinase erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989). Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz über eine Sephadex G50 Säule aufgereinigt, nach Radioaktivität vermessen. Die Fraktion vor dem Radioaktivitätspeak wurde zur Hybridisierung verwendet.

2.2.12 Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Zur spezifischen Detektion von Nukleinsäuresequenzen wurden Hybridisierungen markierter Oligonukleotide mit an Nylonmembranen gebundener Ziel-DNA durchgeführt. Dabei wurden die Sonden mit den Blots bei Salz- und Temperaturbedingungen inkubiert, die eine Ausbildung spezifischer Doppelstränge begünstigen. Eine Erhöhung der Temperatur bedeutete hierbei eine vermehrte Spezifität, wobei gegebenenfalls eine verminderte Sensitivität in Kauf genommen werden mußte. Eine Hybridisierungstemperatur von 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids wurde als optimal angenommen.

2.2.12.1 Berechnung der Schmelztemperatur von Oligonukleotiden

Die Schmelztemperatur (T_m) von Oligonukleotiden ist abhängig vom G/C-Gehalt der Probe, der Ionenstärke der Lösung und der Länge der Probe. Die T_m wurde nach der Formel von Bolton und Mc Carthy (1962) berechnet:

$$T_m = 81,5 - 16,6(\log[Na^+]) + 0,41(\%G / C) - (600 / L)$$

L = Länge des Hybrids in Basenpaaren

Bei Na-freien Lösungen wurde die Schmelztemperatur nach der Faustformel:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

A, T, G, C = Häufigkeit der jeweiligen Basen in der Probe
berechnet.

Die tatsächliche Hybridisierungstemperatur wurde 5-10 °C unter der errechneten T_m gewählt. Der Effekt von "mismatches" wurde mit 5 °C pro falsche Basenpaarung angenommen.

2.2.12.2 Berechnung der Hybridisierungszeit

Die Hybridisierungszeit wurde nach der Formel von Meinkoth und Wahl (1984) errechnet, wobei diese Formel nur die Zeit angibt, nach der die Hälfte der Probe hybridisiert ist.

$$T_{1/2} = \frac{N \ln 2}{3,5 \times L^5 \times C}$$

N = Zahl der Basenpaarungen

L = Länge der Probe

C = Konzentration der Probe in Mol/l

Für die tatsächliche Hybridisierungszeit wurde mindestens der doppelte bis dreifache Wert der Errechneten Zeit angenommen.

2.2.12.3 Hybridisierung mit Digoxigenin dUTP markierten Sonden

Um unspezifische Bindungen der Sonden an die Blotoberfläche zu verhindern, wurde der Blot zuerst für 1 Stunde bei 55°C in 0,5 ml Prähybridisierungslösung (PHL)/cm² Blotoberfläche inkubiert.

Anschließend wurde der Blot in einen Plastikbeutel überführt, 75 ml PHL/cm² dazugegeben und mit 30 ng markierter Sonde/ml PHL versetzt. Der Beutel wurde möglichst luftblasenfrei zugeschweißt und für 1 - 24 Stunden bei der errechneten Hybridisierungstemperatur inkubiert.

Es folgen mehrere Waschschrirte:

- 5 min. bei RT in 2 x SSC, 0,5% SDS
- 10 min. bei RT in 2 x SSC, 0,1% SDS
- 20 min. bei stringenter Temperatur in 0,1 x SSC, 0,1% SDS
- 2 min. in Boehringer Waschpuffer abspülen

Der Blot wurde nun für 30 min. in 1 ml Boehringer Puffer II/cm² Blotfläche bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des Antikörperkonjugates in einer Verdünnung von 1: 10000 wurde der Blot für weitere 30 min. auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde danach durch 2 x 15 minütiges Waschen in Boehringer Waschpuffer entfernt.

Die Sichtbarmachung erfolgte durch Chemolumineszenznachweis. Hierzu wurde der Blot für 2 - 5 min. in Boehringer Puffer III äquilibriert und 5 min. in AMPPD-Gebrauchslösung inkubiert. Der Blot wurde für einige Sekunden auf Filterpapier getrocknet, in einen Beutel eingeschweißt

und 15 min. bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Lichtsignale konnten durch Auflegen eines Röntgenfilms für 2 - 30 min. detektiert werden.

2.2.12.4 Hybridisierung mit ^{32}P markierten Sonden

Die Hybridisierungen erfolgten in Lösungen ohne Formamid. Die Wasch- und Hybridisierungsschritte erfolgten analog zu denen in der nicht-radioaktiven Hybridisierung. Es wurde 1 pmol radioaktiver Probe pro cm² Blotfläche zugegeben. Nach dem Waschen bei stringenten Temperaturen wurden die Blots auf Filterpapier getrocknet, in Plastikfolie verpackt und die Signale durch 1-3tägige Exponierung auf Röntgenfilmen (Du Pont Chronex 4) detektiert.

2.2.13 Ermittlung von DNA-Sequenzen

2.2.13.1 "Klassische Sequenzierung" mit ^{35}S -ATP

Die Ermittlung von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Dideoxy-Methode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung von T7-DNA Polymerase. Hierbei wurde durch die T7-Polymerase, von einer einzelsträngigen Matritzen-DNA sowie einem spezifischen, mit ^{35}S markierten Oligonukleotid-Primer ausgehend, die Synthese des komplementären Stranges in 3' - 5' Richtung gestartet. Diese Reaktion erfolgte in vier parallelen Ansätzen. Durch Zugabe eines Dideoxynukleotides in jeden Reaktionsansatz erfolgte ein basenspezifischer Kettenabbruch und es resultierte eine statistische Mischung aller Kettenlängen, die am 3' Ende mit dem jeweils zugesetzten Dideoxynukleotid enden.

Durch paralleles Auftragen der 4 Proben auf ein Polyacrylamidgel konnte durch einen Vergleich der Laufstrecken der einzelnen Fragmente in den vier Laufspuren auf die Basensequenz des neusynthetisierten Stranges geschlossen werden.

Bei den Sequenzierungsreaktionen wurde der "T7-Sequencing Kit" der Firma Pharmacia eingesetzt und entsprechend den Vorschriften des Herstellers verwendet.

Bei der Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die Template-DNA vorher durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt.

Die Auftrennung erfolgte durch Elektrophorese auf 6%igen Polyacrylamid-Gelen (mit 7 M Harnstoff) für das Lesen größerer Fragmente (200-600 bp), und auf 8% Polyacrylamid-Gelen (mit 7 M Harnstoff) für das Lesen kleinerer Fragmente (50- 400 bp).

Die Proben wurden bei 1,5 kV/90 mA für 2 Stunden aufgetrennt, dann erneut auf das Gel aufgetragen und für weitere 1,5 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele zur Entfernung des Harnstoffes für 10 - 15 min. in 10%iger Essigsäure fixiert und 30 min. gewässert. Nach dem Trocknen bei 37°C über Nacht wurde ein Röntgenfilm direkt auf das trockene Gel aufgelegt und für mindestens 3 Tage exponiert.

2.2.13.2 Direktsequenzierung von PCR-Produkten

Die Direktsequenzierung von PCR-Produkten umgeht den bislang üblichen Arbeitsschritt der Klonierung vor der Sequenzierung. Die PCR-Reaktionen zur Direktsequenzierung wurden mit einer verringerten Menge an PCR-Primern (5 pmol pro 100 µl-Ansatz) durchgeführt, da überschüssige PCR-Primer bei der Sequenzierungsreaktion stören. Wir verwendeten zur Sequenzierung einzelsträngige Ausgangs-DNA. Der Einzelstrang wurde mittels jeweils einem biotinyliertem PCR-Primer unter Verwendung von paramagnetischen Partikeln (Dynabeads, Fa. Dynal, Hamburg) isoliert. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte anschließend wie oben beschrieben mit Hilfe des T7-Sequenzierungskits der Fa. Pharmacia (Freiburg). Zur Markierung kam α -³⁵S-dCTP (Fa. Amersham, Braunschweig) zum Einsatz.

Ein Teil der Sequenzierungen wurde mit Hilfe des Prism-Kits der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt und anschließend auf einem automatischen Sequenziergerät der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt), Typ 373A analysiert. Die einzelnen Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der automatisierten Sequenzierung erfolgte die Markierung durch fluoreszierende Farbstoffe, die automatisch erkannt und ausgewertet wurden.

Zur Sequenzierung wurde die "Genome-walking-Strategie" eingesetzt. Dabei wurden aus den ermittelten Sequenzen direkt die Primer für die weitere Sequenzierung des gelesenen Stranges, sowie für den Gegenstrang festgelegt und synthetisiert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmpaketes PCGENE verarbeitet, auf überlappende Bereiche untersucht und so zur Gesamtsequenz aufgebaut.

2.2.14 Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA erfolgte mit Hilfe der "polymerase-chain reaction" (PCR). Bei dieser Methode (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986 u. 1987) kann ein Bereich doppelsträngiger DNA, welcher zwischen zwei jeweils strangspezifischen Primern liegt, mit Hilfe von DNA-Polymerase in vitro amplifiziert werden. Davon ausgehend, daß die Menge an Template-DNA der begrenzende Faktor der Reaktion ist, kann nach Aufschmelzen des Reaktionsproduktes in Einzelstränge hierbei das Reaktionsprodukt wieder als Template wirksam werden. Es kommt zu einer logarithmischen Vermehrung des zwischen den Primern liegenden, doppelsträngigen DNA-Bereichs. Unter Verwendung von hitzestabiler *Taq*-DNA Polymerase läßt sich dieser Prozeß automatisiert durchführen.

Bei den Versuchen den CAMP-Genbereich zu amplifizieren, konnte zur Festlegung der Primerpaare nicht auf bekannte DNA-Sequenzen zurückgegriffen werden. Es kamen deshalb degenerierte Primer zur Verwendung, deren DNA-Sequenz aus der Aminosäure-Sequenz des CAMP-Proteins (Rühlmann et al., 1988) anhand des universellen genetischen Codes ermittelt wurden.

Es wurden verschiedene Primer, die sich in der Länge und dem Grad der Degeneration unterschieden synthetisiert. Die besten Ergebnisse wurden mit 17mer Primern bei einer Degeneration von 16 - 48 Sequenzmöglichkeiten je Primer erzielt. Die Primer wurden, um eine spätere Einklonierung zu ermöglichen, mit Restriktionsschnittstellen (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*) und einer vorgeschalteten "clamp" von 3-6 Nukleotiden ausgestattet. Das hatte zudem den Vorteil, daß in den späteren Zyklen die Annealtemperatur höher gewählt werden konnte.

Das Reaktionsvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 100 µl und bestand aus:

1 µg template-DNA
200 pmol Forward-Primer
200 pmol Reverse-Primer
10 µl 10X PCR Puffer
200 mmol jedes dNTP
2 U *Taq*-Polymerase
ad 100 µl Aqua Bidest.

Nach Zusammenführen der Reaktionskomponenten mit Ausnahme der *Taq*-Polymerase wurde der Ansatz mit 100 µl Mineralöl überschichtet, um das Verdampfen der wässrigen Komponenten zu verhindern und anschließend 5 min. im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach langsamem Abkühlen auf die gewünschte "Anneal-Temperatur" wurde die *Taq*-Polymerase zugegeben und die ersten 3 - 5 Amplifikationszyklen im Heizblock durchgeführt:

1. Denaturierung: 1,5 min. bei 95°C
2. Primer-Annealing: 1 min. bei 40°C
3. Extension: 1 min. bei 68°C

Danach wurde, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, mit folgenden, stringenteren Bedingungen weitergearbeitet:

27 Zyklen, bestehend aus:

- Denaturierung: 1 min. 94°C
Primer-Annealing: 1 min. 50°C
Extension: 2 min. 72°C.

Zum Schluß wurde die Reaktion noch 7,7 min. bei 72°C inkubiert (Endsegment), damit ggf. vorliegende Einzelstrang-DNA noch zur doppelsträngigen Form ausgebaut werden konnte. Nach Abschluß des Endsegmentes wurde das Mineralöl mit 100 µl Chloroform extrahiert. 10 µl der wässrigen Phase wurden zur Analyse auf Agarosegelen aufgetrennt.

2.2.14.1 "Nested-PCR"

Zur Erhöhung der Spezifität und zur Elimination von "falschen Anneals" wurde eine geringe Menge eines PCR-Produktes als Template in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Von den Primern der zweiten (=nested) PCR-Reaktion ist dabei mindestens einer komplementär zu einem Bereich innerhalb des in der vorausgegangenen PCR-Reaktion amplifizierten Bereiches. Diese Reaktion kann nur dann ordnungsgemäß ablaufen, wenn auch tatsächlich der gesuchte Bereich in der ersten Reaktion vermehrt wurde, denn nur dann finden die Primer der zweiten Paarung ihre Zielsequenz. Um Störungen der zweiten PCR-Reaktion durch überschüssige, nicht verbrauchte Primer aus dem vorherigen Ansatz zu vermeiden wurde die eingesetzte Primermenge in der ersten Reaktion auf je 20 pmol reduziert.

2.2.14.2 Amplifikation von DNA-Bereichen außerhalb bekannter Sequenzen

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen außerhalb bekannter Sektoren wurde die Methode der "Inverted-PCR" (iPCR) nach Trigilia et al. (1988) mit einigen Modifikationen verwendet. Diese Methode dient zur Amplifizierung von Genbereichen, welche direkt an Gebiete mit bekannter Nukleinsäuresequenz angrenzen. Bei der hier eingesetzten Methode sollten sowohl Abschnitte in 3'-, als auch in 5'-Richtung amplifiziert werden (Siehe Abb. 2-2). Hierbei wurden durch selektives Schneiden außerhalb des gesuchten Genbereiches (mittels einer ausgesuchten Restriktionsendonuklease) und anschließender Religation der entstandenen Fragmente ringförmige DNA-Fragmente hergestellt.

Auf diesen Ringfragmenten als Template wurde dann mit Hilfe von beidseitig aus dem bekannten Genbereich weisenden Primern eine Amplifikation mit der PCR durchgeführt. Bei einer geeigneten Größe der Ringfragmente kommt es zur Amplifikation von linearer, doppelsträngiger DNA, deren jeweiliges Ende dem bekannten Genabschnitt entspricht. Von dem bekannten Bereich aus läßt sich durch die entsprechenden Primer dann die Sequenzierungsreaktion starten.

Aufgrund von Vorexperimenten wurde eine Restriktionsendonuklease ausgewählt, die nicht innerhalb des Strukturgens schneidet, bei der aber das Gen tragende Fragment möglichst klein sein sollte.

Chromosomale DNA wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut und in einem Standard-Ligaseansatz wurden die entstandenen Fragmente in sich religiert. Das führte im günstigsten Fall zur Bildung von zirkulären DNA-Fragmenten, die nur aus einem Restriktionsfragment bestanden. Theoretisch konnten aber auch Fragmente aus mehreren Restriktionsstücken gebildet werden.

Aus den äußeren Bereichen des bekannten Genstücks wurden jetzt die Primer so ausgewählt, daß ihr 3'-Ende in Richtung des unbekannten Genbereichs weist. Wurde dieses Primerpaar in eine PCR mit einem entsprechenden zirkulären DNA-Fragment als Template eingesetzt, führte dies zu einer Amplifikation des zirkulären Fragments mit Ausnahme des bekannten Bereiches. Die bekannten Bereiche liegen dann an den Enden des entstehenden linearen PCR-Produktes.

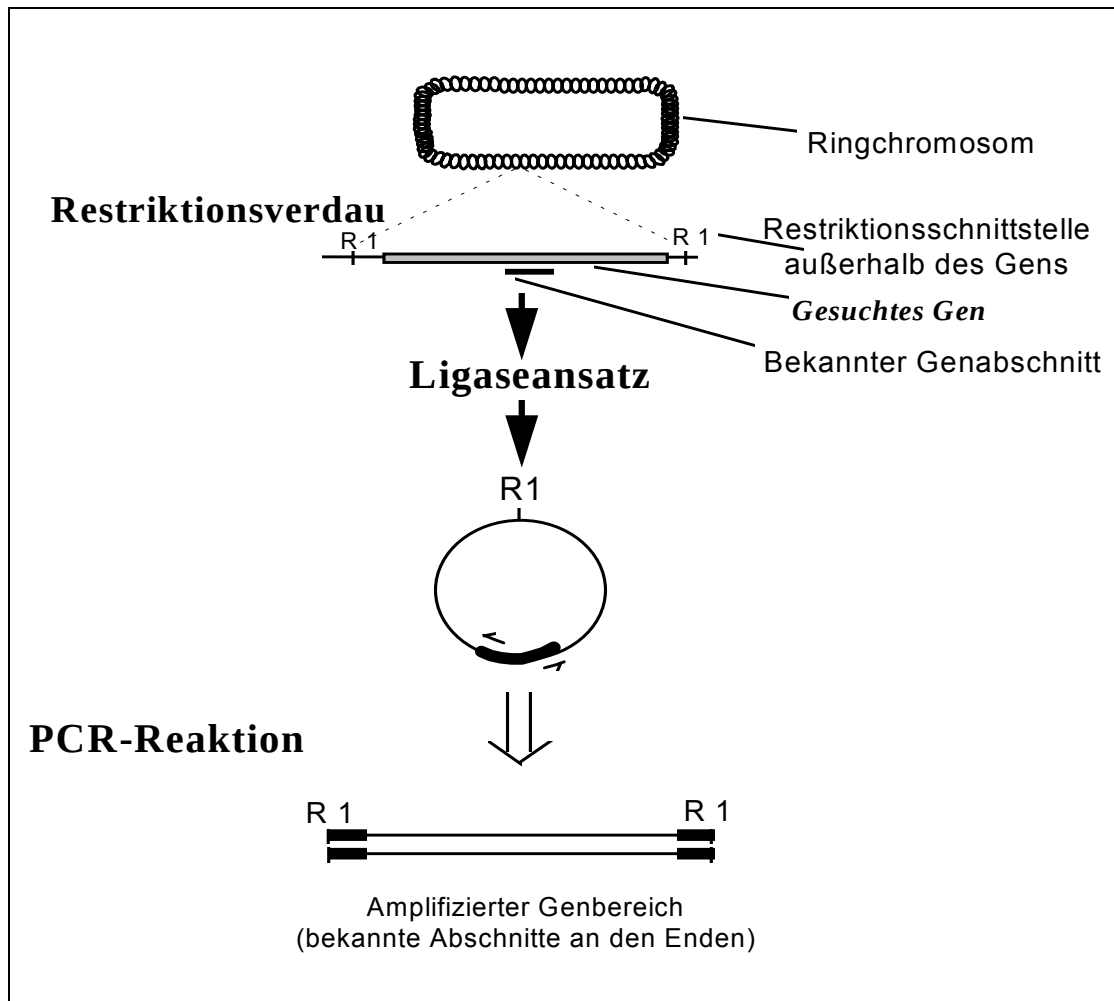


Abbildung 2-1: Prinzip der "inverted-PCR"

Protokoll:

1 µg chromosomaler DNA wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease komplett verdaut und in einem Standard-Ligaseansatz (20 µl Volumen, 2 Units T4-Ligase, entspr. Puffer) religiert.

Die Enzyme wurden mit einem Phenolisierungsschritt entfernt, die DNA mit Äthanol gefällt und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

1/10 dieses Ansatzes (=1 µl) wurde in einen Standard PCR-Ansatz als Template eingesetzt. Die Anneal-Temperatur wurde dabei möglichst hoch gewählt, um die Spezifität zu erhöhen

3 Ergebnisse

3.1 Restriktionsanalyse von pCO63

Zur Subklonierung des rekombinanten Fragments und damit zur näheren Eingrenzung des postulierten CAMP-Faktor-Genbereichs wurde das klonierte Fragment des Plasmids pCO63 mit verschiedenen Kombinationen von Restriktionsendonukleasen behandelt und die Lage der Schnittstellen durch Größenanalyse der entstehenden Fragmente bestimmt. Für folgende Enzyme fanden sich Schnittstellen im rekombinanten Fragment: Die Lage der Schnittstellen ist in Abb. 3-1 dargestellt.

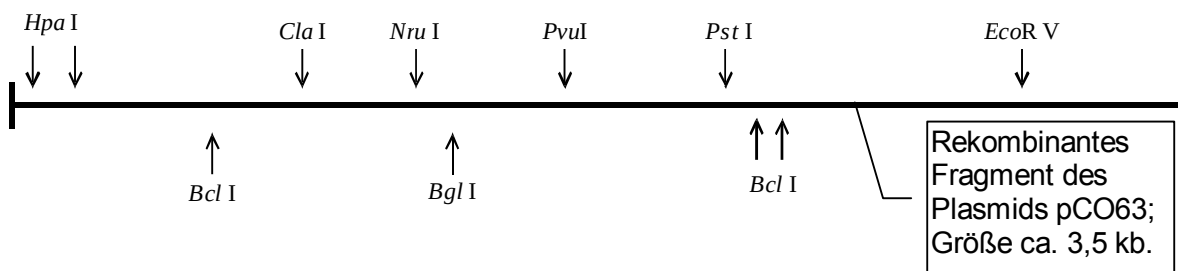


Abbildung 3-1: Schnittstellen ausgewählter Restriktionsenzyme im Insert von pCO63, Enzyme mit mehr als drei Schnittstellen im kloniertem Fragment wurden nicht dargestellt. Keine Schnittstellen fanden sich für folgende Enzyme: *BalI*, *BamHI*, *EcoRI*, *KpnI*, *NotI*, *SacI*, *SalI*, *SmaI*, *XbaI*, *XhoI*.

Zur weiteren Subklonierung wurden die mit *PstI* erzeugten Fragmente des Gesamtinserts verwendet, welche das Ausgangssegment in ein ca. 1400 bp sowie ein 2200 bp großes Fragment spalten.

3.2 Subklonierung in Plasmiden

Die Subklonierung erfolgte,

- i) um das Insert aus dem ursprünglichen pHS 575 Vektor von Takeshita et al. (1987) in einen high-copy-number Vektor der pUC-Gruppe zu verbringen,
- ii) um durch die Aufteilung in zwei Subfragmente die Sequenzierung zu vereinfachen und ggf. die Lokalisation funktionswichtiger Bereiche zu ermöglichen.

Die Einklonierung der beiden mit *PstI* erzeugten Fragmente erfolgte in pUC18/19 Plasmide. Zur Klonierung des 2,2 kb großen Stücks wurde die *EcoR I* und die *Pst I*-Schnittstelle des pUC19-Polylinkers verwendet. Das 1,4 kb große Stück wurde in die *Pst I* und die *Hind III*-Schnittstelle des Polylinkers einkloniert.

3.3 Funktionstestung der Subklone

Zur Testung der CAMP-Aktivität der Subklone und damit auch zur Lokalisation funktioneller Genbereiche erfolgt eine Testung der Klone in verschiedenen Kohämolysseassays. Die Subklone sowie der Ausgangsklon wurden auf CAMP-Aktivität untersucht. Sowohl in der

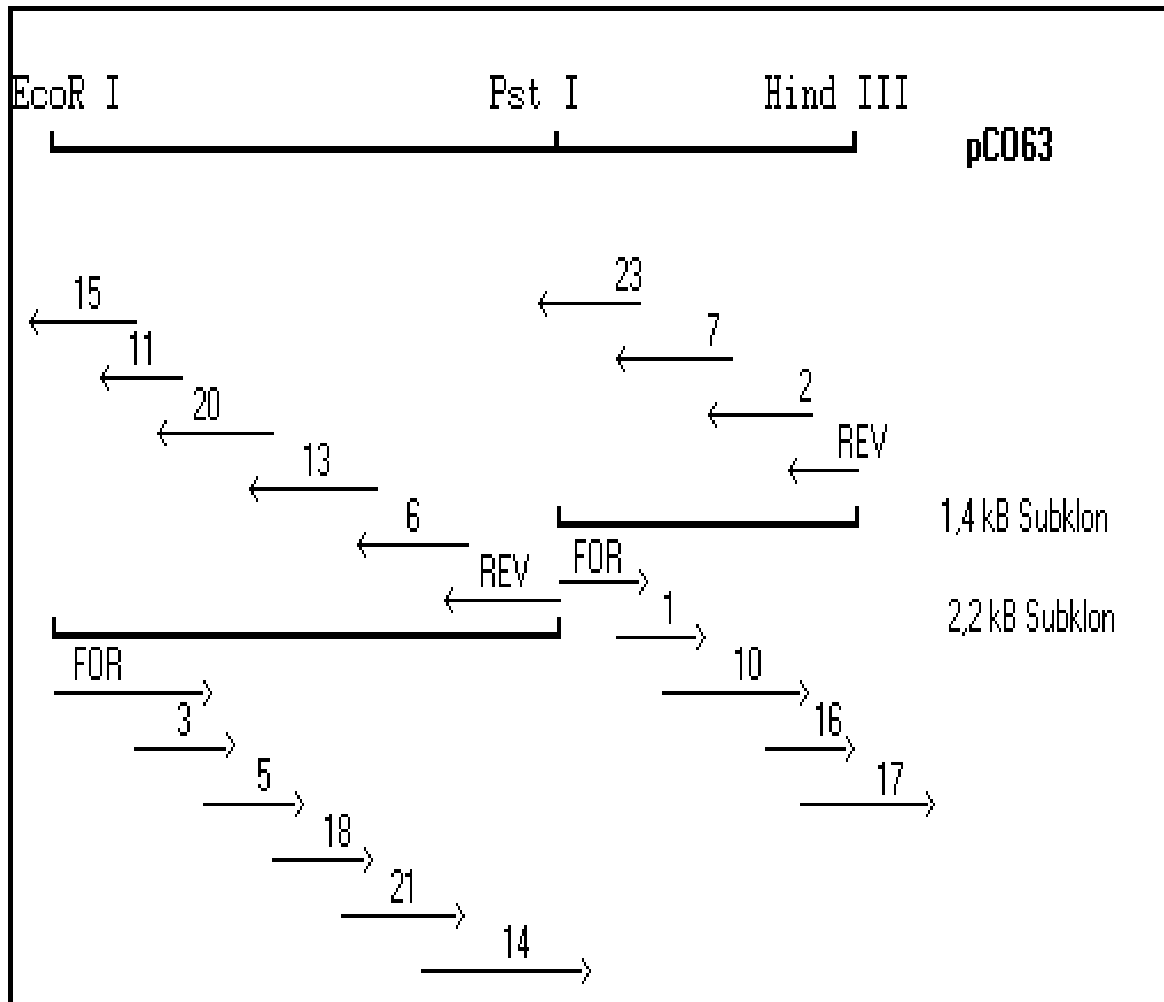


Abbildung 3-2: Strategie zur Sequenzierung von pCO63

Zahlen = Individuell synthetisierte Primer

FOR = Universal-Forward-Primer

REV = Universal-Reverse-Primer

Testung auf Schafblutagarplatten (CAMP-Plattentest) als auch im Flüssigtest von durch Sonifikation hergestellten Proteinpäparationen ließ sich keine eindeutige kohämolytische Aktivität nachweisen.

3.4 Sequenzierung der Subklone

Die Sequenzierung wurde nach der "genome-walking"-Strategie vorgenommen (siehe Abb. 3-2), bei der aus der jeweils gelesenen Sequenz der nächste Primer festgelegt wird. Die

verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Es wurden beide Stränge sequenziert. Ausgehend von den beiden 1,4 kB und 2,2 kB großen Subklonen wurde jeweils zuerst mit den Standard-Forward- und -Reverse-Primern sequenziert und anschließend nach der "genome-walking-Strategie" weiter fortgeschritten (Abb. 3-2). Die folgenden, selbstsynthetisierten Primer wurden chronologisch durchnummeriert.

Name	Position (bp.)	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)
pCO63-1	2266-2285	AGT CTG ATC AGC TAC TAA T	61,1
pCO63-2	2039-2058	TCA GGA TCA TCA GTG TGA GA	61,2
pCO63-3	402-421	CAG TCA CAC GGT GGC TCA GG	66,0
pCO63-4	2564-2545	CGA ATC CAT GTC AAC ATT AG	64,2
pCO63-5	919-938	AGT CTA TCC TCG CAG AGC CA	70,3
pCO63-6	2446-2465	TAA TGT TGA CAT GGA TTC GG	64,2
pCO63-7	1753-1734	CGA ATA CAA GAG ATA TGA AT	60,0
pCO63-8	2593-2611	TGC TGA TCC ATT TGC ATC TGT	67,3
pCO63-9	744-763	GCA CAG GAT TTG TTC GGG CA	70,0
pCO63-10	1737-1756	CAT ATC TCT CTT GTA TTC GTC	65,0
pCO63-11	763-744	TGC CCG AAC AAA TCC TGT GC	70,3
pCO63-12	1486-1467	ACT TCC GCA CAT GGC GAA GGA	70,8
pCO63-13	411-392	CGT GTG ACT GAC GAA TCA CC	70,3
pCO63-14	2814-2833	ACA CAT GCA GTA GGC GTC CA	70,3
pCO63-15	3108-3127	GTA TTA TAC TGC TAT ATC C	58,9
pCO63-16	1354-1373	TCG CCG TTG TGG CTG CCG GT	74,6
pCO63-17	3491-3473	TCA TCA TTT TAA CTG AGC ATC	63,0
pCO63-18	3054-3035	CAA CGA ATA TCG CTG TTG CC	70,3
pCO63-19	2256-2227	GAA AAC AAT GCA ACT CCT GTC	70,8
pCO63-20	1069-1050	AGC GTC GCG CGG ACG GTA GA	70,3

Tabelle 3-1: Zur Sequenzierung von pCO63 verwendete Oligonukleotide. Zusätzlich wurden an den Rändern der jeweiligen Subklone die M13-Universalprimer (Forward und Reverse) eingesetzt. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die abgedruckte Sequenz (Abb. 3-3). Die T_m-Werte wurden mit Hilfe des OLIGO-Programms nach der "nearest-neighbor-Methode" errechnet.

Die so bestimmten Teilsequenzen wurden mit Hilfe des PCGENE-Programmpaketes auf Überlappungen untersucht und zur Gesamtsequenz aufgebaut.

Gegenüber anderen kodierenden Genbereichen aus Prokaryonten fällt der hohe Anteil an Adenin und Thymidin in der Basensequenz auf. Dieser hohe A/T-Anteil ist ein bereits

mehrfach beschriebenes Merkmal von Gensequenzen aus der Gattung *Streptococcus*. Die Sequenz (s. Abb.3-3) besteht aus 3505 Basenpaaren und enthält ein offenes Leseraster (Basen 1314 - 2066). Dieses kodiert für ein putatives Protein von 251 Aminosäuren. "Upstream" dieses Leserasters findet sich eine Ribosomenbindungsstelle (Shine-Dalgarno-Box) und entsprechend an typischer Stelle gelegene Promotorsequenzen (-35 bp.-Box: Pos.: 1259-1265, -10 bp.-Box: Pos. 1278-1284), die in einigen Positionen von den klassischen σ -70-Konsensussequenzen (Hawley, McClure, 1983 und Harley, Reynolds, 1987) abweichen. Ein mögliches Transkriptions-Terminationssignal fand sich in Form einer potentiellen "stem loop"-Struktur ca. 30 bp. unterhalb des Stop-Codons (Pos. 2092-2114). Weitere möglicherweise funktionell aktive offene Leseraster wurden nicht gefunden.

Die abgeleitete Proteinsequenz des offenen Leserasters zeigte in der Sequenz keine Ähnlichkeiten mit der bekannten Aminosäuresequenz des CAMP-Faktors (Rühlmann et al., 1988). Sie wurde deshalb mit Hilfe des PCGENE-Programms einem Sequenzvergleich mit den in der SWISSPROT-Datenbank gespeicherten Proteinsequenzen unterzogen. Hierbei stellte sich eine 100%ige Übereinstimmung mit einer CDP-Diglycerid-Hydrolase aus *E.coli* (Icho et al., 1985) heraus. Auch der Abgleich der Nukleinsäuresequenzen über den veröffentlichten Genbereich der CDP-Diglycerid-Hydrolase ergab eine 100%ige Übereinstimmung.

Bei radioaktiver Markierung des Gesamtfragmentes aus pCO63 zeigte sich in Hybridisierungsexperimenten keine Hybridisierung mit chromosomaler DNA aus Gruppe B Streptokokken, jedoch eine eindeutige Hybridisierung mit der *E. coli* Kontroll-DNA. Zusätzlich wäre ein so hoher Konservierungsgrad von DNA-Basensequenzen zwischen nicht sehr nah verwandten Spezies extrem unwahrscheinlich, es handelt sich bei dem in pCO63 einklonierten DNA-Fragment daher vermutlich um ein Fragment eines *E. coli* Genoms.

Abbildung 3-3 (folgende Seite): **Basensequenz des klonierten Fragments von pCO63.** Die **-35 Bp.** Sequenz und die **-10 Bp.** Sequenz des vermuteten Promotors sind fett gedruckt und die Promotorelemente sind entsprechend beschriftet. Die Shine-Dalgarno-Sequenz (**RBS**) ist fett und kursiv gedruckt. Der nach Ichio et al. bestimmte **Transkriptionsstartpunkt** ist fett gedruckt und doppelt unterstrichen. **Start- und Stopcodon** des offenen Leserasters sind fett und unterstrichen dargestellt.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
	CTGCAATTTATTGAAATTTGCAAACTTTGTAGGCCGGATTAAGCGCTTCGCGCCGCAATCCGGCATGGACAAAGCGCACTTTGTACGAATATGAGCGGATTTCTTCGCGCTTTTAATCC											
121 -	CTCAACATATACCCGCAAGTTATAGCCAATCTTTTTATTCTTTAATGTTTGGTTAACTTCTGGCACGCTTGTCTCATCACAACACAACATTAAGAGAGTCGGGCGATGAACAAGTGGG											
241 -	GCGTAGGGTTAACATTTTGTCTGGCGGCAACACAGCGTTATGGCAAAAGGATATTACGCTTCTTAACGTTTCATATGATCCAAACGCGGAAATGTACGAACAGTACAAACAAGGCAATTCAGCG											
361 -	CCCAGTGGAAAAAGCAAACTGGTGTAAACGTGGTGTATTCGTACGTACACGGGTGGCTCAGGTAAACAAAGCAAGTCGGTAATCAACGGTATTTGAAGCTGATGTTGTACGCTGGCTCTGG											
481 -	CCTATGACGTGGACGCAATTGGCGAAACCGGGCGGGAATTGATAAAGAGTGGATCAAAACGCTGCGCGGATTAATCCGCAACCGTACACTTCCACCAATGTTTTCCTGGTACGTAAGGAAAAATCC											
601 -	GAAGCAGATCCATGACTGGAAACGATCTGATTTAAACCGGGTGTCTTCGGTGTACACGCTTAATCCGAAAGCTCTGGTGGCGGCGCTGGAACTACCTGGCAGCTGGGCTACGCGCTGCATC											
721 -	ACAACAACAACGATCAGGCAAAAAAGCACAGGATTTGTTCCGGGCACTGTATAAAAACGTGCAAGTTCTGGCGGCGGTGGCTCCACATAACACTTTTGTGAGCGCGGAAATTTGACGATGTACT											
841 -	GATTGCTGGGAAAAAGCAAGCTCTGCTGGCAGCGCAATGAATCTGGGAAAAAGATAAATTCGAAATCGATCAACGCCAGTGAAGTCTAATCTTCGACAGGCAACCGTGTCCGTTGTCATTAAG											
961 -	TGCTCGAGAAAAAAGGTACTTAAGAGGTGGCGGAAGCCCTACCTGAATATCTCTACTCGCCAGAAAGTCAAGAAATTTGCCGCAAAAACATACTACCGTCCGGCGAGCGCTGAAGTGGCGA											
1081 -	AAAAATACGAAAAATGCGTTTCCAAAGCTGAAGTTATTACCAATTTGATGAAGAGTTCCGGCGCTGCAACGAAAGCGCAAAAAGACATTTTGTCTAACGCGGTACGTTGATCAGATCAGCA											
1201 -	AAACGCTGATTTCCCAAGATATAATTATCAAAACCGGCTGTTTCTCGCAGCGGGTTTTTTTATTTGGTCA ^{-35bp} CGATTTTGGCGTTTACCCTTGGCATCT ^{-10bp} TTTGAAGTTACA ^{RBS} GCGAAAAAAGATGA ⁻¹³²⁰											
1321 -	AAAGCGGCTCTCTTTTTTTGGTGTATGATAGTTATCGCGTGTGGCTGGCTGGCGGTATTTGTTACTGGAATTTAAACCGGTGAAGAGTCGGATACATTAAGTATGTAAGATTGTCTTGAGGAATGT											
1441 -	TTGCCCAATACGACGCAAAATCAAAATCTTTCGCCATGTGCGGAAGTCAAAACCAATGCCGATACGTTGGTTTAAAGATCTTAAATGGCCCACTGCAATATCTGTTGATGCCAACGTAT											
1561 -	CGTATTAAACGGTACTGAAAAGTCCTTTGTGTGACCGCATCTTCAACGCCGAACCTTCTTTGGTTGGCTTGGCAGCGCGGATTTTATAGCAAAAAATACCGGCCAGCCGGTTCCGATCGC											
1681 -	GCGGTTTCTTTGGCGATCACTCCCGCAACGGGGCGTACGCAAAACCAATTTTCATATTCAATCTCTTGTATTCGCTCGATGTGCGCAACACAGCTGGATTAACATCTGGCGAACATCAGC											
1801 -	AGCGCGCTGTTGCCCACTGCCAGGTGTTTGGCGGGGCATGAATACCTGGCGCGTCCGGTTAACGGAAAGCGCACTGGTTACAACGCAAGCCCATTTATGATGCTGGCAAGAAGTACCTGAG											
1921 -	GCGCGGGAACATATGGGACGCTACGGGCTGGCGAGTGTACGGGCAAGTGAATACTCATTTGTATGTGCTGGCGACACAAAGAAATCTAATGACGCTTAAACCGTTCAGCCGAGAAATTT											
2041 -	CAGGATCATCAGTGTGAGATTTTGGCTGA ^{TAAG} GGCGGAAGATTAAAGAAAGTAGTGCCGGAATGAAATCCGGCACCTGTCAAGCTTAAGCCTGTTTAAAGCGCTTCGACGTATATTAAGT											
2161 -	TAATTTGAATTTAGAGGGA ^{TAAG} AAAAACCATGGCAAAAGAAACAAAGTAGTCTAATTTTCCATAGCTAATTTTGACAGAGTGGCATGTTGTTTCTCCAGCGAFTTTGGAAATTTCATGCTCATCAGCT											
2281 -	ACTAATCATGTCGTAGTTATGTCAAGTTAATAATCAACAACAAATATAAAACAAAAAATTGATCAAGATAGTGTTCATATGAATACTATTAAAAATCAAGTTCAAGCACAGATTATGA ⁻²⁴⁰⁰											
2401 -	CCTGTAGATACCTGCTATAATGTCTGTGTATAGATGAAGTCTTCTTTAAGTGGTAAATCCAGCGACATCTACGAGCTGTATGTACAGCTTGAAGCTTCCAGGTGATGAGCATATTTCA ⁻²⁵²⁰											
2521 -	CATACCTTGACTACAAAGTACAACTAATGTTGACATGGAATTCGGATTAATCTAAATTAGTTATTCGTATGCTGATCTCATTGTCATCTGTGATTTCTAT ⁻²⁶⁴⁰ AAAAAGCACATGACGAAGT											
2641 -	GAAGCAATTTAGAA ^{TAAG} CAAAAGTAAATGACTATCCAGATTTTGAAGCAACAGATAAAGCAACTATTTTATACTAAGTCAAAACCTGGACAAAGCAATTTGGGATATTTGCTGTACAAAGAGCA ⁻²⁷⁶⁰											
2761 -	AAAGTTTAAACAAGAAAAAGTTTGAATGTTTATATAATGCTTTAAATAAAGCTATCACACATGACAGTAGGCGTCCCAATTTAAATCCTAATGTAAACCGTTCAAGAAGTGATCAAGAGATTGTG											
2881 -	AACCTTCAAAATGGCACTTCAAACTGCTTTTGAATGAGTTGATCTAAACGAGGTAATACTAAATCTCCGGTCCGTTCTATCAAAATTAATTAATAATATATGAGCCATTTATTAA ⁻³⁰⁰⁰											
3001 -	ATAAAAAGAAATGATAGTTTATTGTTCTTTTGAAGGCAACAGCGATATTTCGTTGTCCTTTTGAATATCTGATTTATAAATAGACTAAATTAATTTGATATATGATTTATTA ⁻³¹²⁰											
3121 -	TATATCCAAATTTATAGATATATAAAGTAAATACAGCTTAGGTTCAAAATGATTTTGTAGTGTACATTTTATAAATATTTTATAGGTAAACGATGTGATATTTTATATAATTAGG											
3241 -	TTTATACAAAGAAAAATATAGAAATTAACGTTTATAGCATCAAAAAGTATTAAATTAAGTATATGAGAAGTGAACATTATGTCTAATGTTGTTGTGAGGGTTGATGA ⁻³³⁶⁰ CAAGTAA ⁻³³⁶⁰ AAAAAGAA											
3361 -	CTGTTGAGATATGCTTTGTAGTTTACTATTTGTGTGTATGAATAAATAGTGAATACAAATAGTGAATCAAAATTAAGTTGAGGTGATATTAATGTCACACAGTAGCAAGTAAAGTTGATGCTCA											
3481 -	GTTAAAAAGATGAAGCAACAAGCTT. Gesamtzahl der Nukleotide: 3505 bp, davon: A: 1077; C: 664; G: 797; T: 967. ⁻³⁴⁸⁰											

3.5 Nachweis des CAMP-Faktor-Gens mittels degenerierter Oligonukleotiden

Da in dem Plasmidklon pCO63 das CAMP-Faktor-Gen offenbar nicht enthalten war, mußte eine Neuklonierung aus chromosomaler Gruppe B Streptokokken-DNA versucht werden. Um diesen Klonierungsprozeß unabhängig vom Nachweis der CAMP-Faktor Aktivität und ohne Anwendung eines Anti-CAMP-Serums durchführen zu können wurden zunächst degenerierte, gegen das *cbf*-Gen gerichtete Oligonukleotidsonden entwickelt.

3.5.1 Festlegung von DNA-Sonden auf Grund einer bekannten Aminosäuresequenz (Pools degenerierter Primer)

Bei der Entwicklung von DNA-Sonden aus Aminosäuresequenzen war zu beachten, daß wegen der Degeneration des genetischen Codes aus einer bestimmten Aminosäuresequenz keine eindeutige DNA-Sequenz bestimmt werden kann. Sollen in einem solchen Fall DNA-Sonden hergestellt werden, besteht daher nur die Möglichkeit Pools von Oligonukleotiden zu verwenden, in denen jeweils alle in Frage kommenden Kombinationen der Nukleotidsequenz vertreten sind.

Es gibt nur zwei Aminosäuren, die durch genau ein Basentriplet kodiert werden (Methionin, Tryptophan) sowie neun Aminosäuren, die durch zwei verschiedene Basentriplets kodiert werden und neun Aminosäuren, die durch 3 - 6 Basentriplets kodiert werden. Deshalb ist die Zahl der in einem Pool von Oligonukleotiden enthaltenen Sequenzmöglichkeiten entscheidend von den "zurückübersetzten" Aminosäuren abhängig. Es galt hier die günstigste Aminosäurefolge in der zu detektierenden Sequenz ausfindig zu machen und einen geeigneten Kompromiß zwischen Länge der Sonde und der Zahl der Variationsmöglichkeiten der Sequenz zu finden. Dies wurde mit Unterstützung eines Rechnerprogrammes aus dem PCGENE-Programmpaket (PROBE) ausgeführt. Die Möglichkeit, die Variationen der Sequenzen mit Hilfe einer "Codon-Usage-Tabelle" (Lathe, 1985) anhand der in einer Spezies häufiger für eine bestimmte Aminosäure benutzten Basentriplets weiter einzugrenzen bestand nicht, da noch nicht genügend Sequenzen aus GBS veröffentlicht waren, um eine derartige Tabelle zu erstellen.

Die Sondenlänge wurde mit 20 bp festgelegt, daraufhin wurden Sonden aus den Bereichen um die Aminosäure Methionin (Pos.21) sowie um die Aminosäure Tryptophan (Pos.167) generiert. Die Sonde aus der Sequenz der Aminosäuren 163 - 169 (= CAMP I) ist ein Pool aus 48 verschiedenen Oligonukleotiden, die Sonde aus der Sequenz der Aminosäuren 16 - 22 (=CAMP II) ist ein Pool aus 64 verschiedenen Oligonukleotiden.

CAMP I:

3' -CTR	TTY	CTY	TAD	ACC	TTR	TG-	5'	Probe
Asp	Lys	Glu	Ile	Trp	Asn	Thr		Protein

CAMP II:

3' -TTR	GTY	GCN	GTY	GTY	TAC	GT-	5'	Sonde
Asn	Gln	Ala	Gln	Gln	Met	Gln		Protein

Eine weitere Schwierigkeit beim Arbeiten mit degenerierten Primerpools war die Feststellung der optimalen Hybridisierungstemperatur. Da immer von dem höchsten möglichen A/T-Gehalt auszugehen war, mußte die niedrigste mögliche T_m als Hybridisierungstemperatur angenommen werden. Bei den beiden vorliegenden degenerierten Sonden pools wurde zunächst mit einer Hybridisierungstemperatur von 37 °C hybridisiert.

Mit den degenerierten Oligonukleotidsonden CAMP I und CAMP II wurden Southern Blots der DNA des Plasmids pCO63 und der mit *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII* geschnittenen chromosomalen DNA aus Gruppe B Streptokokken (Stamm DSM 2134) hybridisiert. Während im Fall der Plasmid-DNA aus pCO63 kein Signal sichtbar wurde, war im Fall der genomischen DNA jeweils ein eindeutiges Signal zu erkennen (Abbildung 3-3).

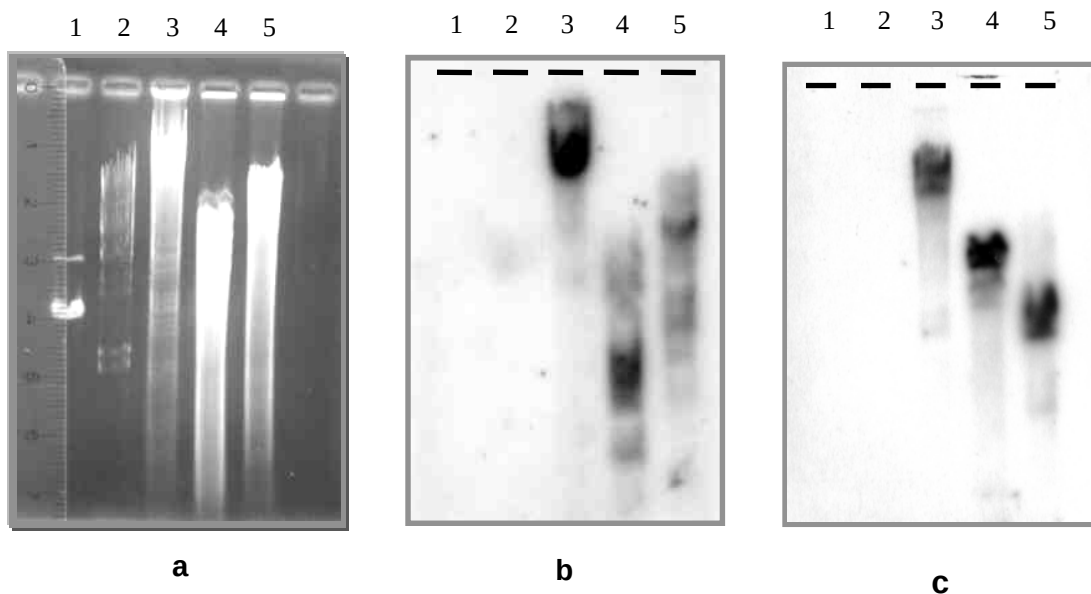


Abbildung 3-4 (a – c): a: Agarosegel, Ethidiumbromidfärbung. b: Southern-Blot des Gels (a), Hybridisierung mit ³²P-markierter CAMP I-Sonde. c: Southern-Blot von Gel (a), Hybridisierung mit ³²P-markierter CAMP II-Sonde.

Auftrag der Proben:

- 1 = pCO63 Plasmid-DNA, *EcoRI* + *HindIII* Verdau
- 2 = λ-Dna, *HindIII*-Verdau (Größenmarker)
- 3 = R268 chromosomale DNA, *BamHI*-Verdau
- 4 = R268 chromosomale DNA, *HindIII*-Verdau
- 5 = R268 chromosomale DNA, *EcoRI*-Verdau

Dieses Resultat belegte, daß die verwendeten Sonden trotz der degenerierten Sequenz zu eindeutigen Hybridisierungsprodukten mit genomischer GBS-DNA führten. Die fehlende Bindung an pCO63-DNA war ebenfalls ein Indiz für die Spezifität dieser Sonden. Die aus der genomischen DNA resultierenden Hybridisierungsbanden wiesen in Abhängigkeit von den verwendeten Restriktionsenzymen eine unterschiedliche Größe auf. Im Fall des Verdau mit *HindIII* konnten mit der CAMPI- und der CAMPII-Sonde verschieden große Banden detektiert werden. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis auf eine *HindIII*-Schnittstelle im CAMP-Faktor-Gen gewertet (Abbildung 3-4).

3.6 Versuche zum Aufbau einer CAMP-Faktor-Gen (cbf-Gen) gewichteten Genombank in E. coli

Da die Resultate der Hybridisierungsexperimente andeuteten, daß das Restriktionsenzym *EcoRI* keine Schnittstelle im CAMP-Faktor-Gen aufwies und die CAMP-spezifischen Fragmente beim Verdau mit diesem Enzym mit eine Größe von ca. 4,0 kb (+/-0,5 kb) eine potentiell gut klonierbare Größe aufwiesen, sollte zunächst die Klonierung von mit *EcoR I* geschnittener chromosomaler Gruppe B Streptokokken-DNA versucht werden. Um das gesuchte Fragment gegenüber den restlichen Genomfragmenten anzureichern wurde die mit *EcoRI* verdaute genomische DNA in einem Low-meltig-point-Agarosegel aufgetrennt, Fragmente in einem Größenbereiche von 3,0 - 6,0 kb ausgeschnitten und aus der Agarose zurückgewonnen. Diese DNA-Fragmente wurden im folgenden als Insert-DNA zur Klonierung verwendet.

Als Klonierungsvektor diente das pUC19 Plasmid. Dieses wurde vor der Ligasereaktion mit alkalischer Phosphatase vorbehandelt, um die Gefahr der Religation bei Klonierungen in eine singuläre Schnittstelle zu verringern.

Trotz 4facher Wiederholung des Versuchs konnten nie mehr als 17 rekombinante Klone erreicht werden.

Dies ließ sich in Kontrollexperimenten durch die mangelhafte Ligation mit den dephosphorylierten Vektoren und durch nicht vollständig zu entfernende Verunreinigungen der genomische DNA-Fragmente mit Agarose-Resten erklären. Die erzielten rekombinanten *E. coli*-Kolonien wurden zur Überprüfung in Kolonie-Blot Hybridisierungen mit den degenerierten CAMP-Sonden überprüft. In keinem Klon ließ sich ein *cbf*-Genfragment nachweisen.

3.7 Klonierung des cbf-Gens mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Eine weitere Möglichkeit zur Klonierung des CAMP-Faktor-Gens (*cbf*-Gen) bot die Amplifikation des Gens mit Hilfe der polymerase-chain-reaction (PCR) und den schon als

Sonden gebrauchten degenerierten Oligonukleotid-Pools CAMP I und CAMP II. Die besondere Schwierigkeit dieser Methode lag in der Verwendung von degenerierten Primern, also Primer-Pools an Stelle von eindeutigen Primern. Dadurch bestand die Gefahr der Primerbindung an anderen als den beabsichtigten Stellen im Genom und damit der Amplifikation einer anderen als der gesuchten Sequenz.

Zur Verwendung als PCR-Primer wurden die ursprünglichen Sondensequenzen wie folgt modifiziert::

- Um die Zahl der Wobble-Positionen zu reduzieren, wurde die Länge der Primer auf 14mere, bzw. 17mere verkürzt.
- Um ein funktionsfähiges PCR-Primerpaar zu erhalten, mußte von einer Sonde die komplementäre Sequenz in die Reaktion eingesetzt werden.
- Die eigentlichen Primersequenzen wurden zur späteren Klonierung mit Restriktionsschnittstellen versehen.

Durch die Degeneration der Primer und die "mismatch"-Positionen der Restriktionsschnittstellen wiesen die Primer eine relativ niedrige optimale Bindungstemperatur (T_m) auf. Diese Eigenschaft erhöhte die Gefahr unspezifischer Bindungen im Rahmen der PCR.

Um die Nachteile der niedrigen Bindungstemperaturen zu begrenzen, wurde die PCR mit diesen Primern im Modus der "shift-PCR" durchgeführt. Dazu wurde die Bindungstemperatur anfänglich über einige Zyklen niedrig gehalten. Wenn genügend spezifische *cbf*-Kopien aus den vorherigen Zyklen als neue Zielsequenzen vorlagen, wurde anschließend die Bindungstemperatur erhöht um dann nur noch die gesuchte Sequenz spezifisch zu vermehren.

Bei Verwendung der 14-mer Primer kam es durch die niedrige T_m zur unspezifischen Amplifikation verschiedener Fragmente. Da aus diesen mit den unten beschriebenen Methoden kein CAMP-Faktor-spezifisches Fragment isoliert werden konnte, wurden im folgenden 17-mer Primer mit höherer Spezifität entwickelt und eingesetzt.

I. 14-mer Primer:	II. 17-mer Primer:
CAMP-14FOR (mit Extension 3): 5'-CARCARATGCARAA-3'	CAMP-17FOR: (mit Extension 3): 5'-CARGCNCARCARATGCA-3'
CAMP-14REV: (mit Extension 2) 5'-TTCCADATYTCYTT-3'	DEGEN 2: (mit Extension 2): 5'-GTRAANYGNGTRTTCCA-3'
CAMP-III-Sonde: 5'-CCCATRTCDATRTT-3'	DEGEN 1: (mit Extension 1): 5'-GCNAAAYATHGAYATGGG-3'

Tabelle 3-2: Degenerierte Oligonukleotide zur Klonierung

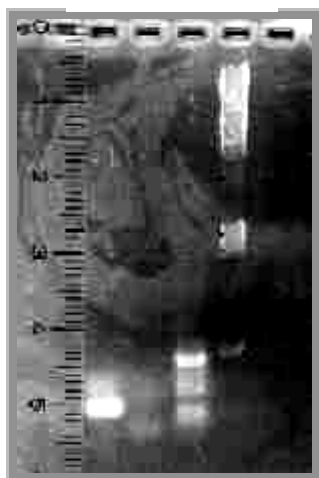
Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsenzym	Verwendet mit Primer:
EXT 1	CCC CCC CTG CAG	<i>Pst</i> I	DEGEN 1
EXT 2	CCC CCC GGA TCC	BamHI	DEGEN 2, CAMP14REV, CLON 1
EXT 3	CCC CCC GAA TTC	<i>Eco</i> RI	CAMP14FOR, CAMP17FOR, CLON 2, CLON 4

Tabelle 3-3: Verwendete Extensionen zur Klonierung von PCR-Fragmenten.

Auch bei Verwendung der 17mer Primer (CAMP17FOR / DEGEN 2, CAMP17FOR / DEGEN 1; DEGEN 1 / DEGEN 2) kam es zur Amplifikation mehrerer PCR-Produkte. Diese wiesen Größen von 195 bp, 300 bp, 450 bp, 800 bp, 1500 bp und 1800 bp auf.

Die Primerpaarung CAMP-17FOR und DEGEN 2 ergab eine starke Bande von ca. 450 bp Größe sowie mehrere schwächere, meist kleinere Fragmente.

1 2 3 4

**Abbildung 3-5:**

Agarosegel, Ethidiumbromidgefärbt. PCR-Produkte der Paarungen degenerierter Primer mit chromosomaler DNA des Stammes R268 als Template-DNA.

1 = Primerpaar: DEGEN 1 / DEGEN 2

2 = Primerpaar: CAMP17-FOR / CAMP III-Sonde

3 = Primerpaar: CAMP17-FOR / CAMP 14-REV

4 = *Hind* III geschnittene λ -DNA

Die Größe des spezifischen Fragmentes wurde durch Vergleich mit *Hae*II geschnittener Φ X174-DNA mit ca. 1,95 Kb bestimmt. Dieses Produkt wurde in pUC19 einkloniert (= pKLN019).

Die Paarung DEGEN 1 mit DEGEN 2 ergab nur eine deutliche Bande von ca. 195 bp. Größe und war damit das spezifischste Primerpaar (Abbildung 3-5).

Die PCR-Produkte wurden im low-melting-point-Agarosegel aufgetrennt. Die 450 und 195 bp.-Fragmente wurden nach der Extraktion aus "low-melting-point"-Agarosegelen mit Hilfe von NACS-Affinitätschromatographiesäulen (Fa. Gibco BRL) aufgereinigt. Schließlich wurden die so präparierten Fragmente mit Hilfe der am 5'-Ende der Primer angefügten Restriktionsschnittstellen (EXT 1-3) in einen pUC-Vektor inkloniert.

Da die theoretisch zu erwartende Größe der PCR-Produkte aus der Paarung CAMP17FOR und DEGEN 2 ca. 480 bp. beträgt und dieses Fragment einen großen Teil des CAMP-Faktor-Strukturgens enthält, konzentrierten wir unsere Bemühungen zuerst auf die Fragmente mit der Größe von ca. 450 bp, welche zum Vergleich aus verschiedenen Gruppe B Streptokokken-Stämmen inkloniert wurden.

3.8 Analyse der rekombinanten Plasmide

3.8.1 Hybridisierung mit einer degenerierten Oligonukleotid Sonde

Die präparierte Plasmid-DNA wurde mittels Southern Blot- Hybridisierung mit der CAMP III-Sonde hybridisiert.

Keines der rekombinanten Plasmide zeigte in diesem Ansatz ein eindeutiges Hybridisierungssignal mit der CAMP III-Sonde.

3.8.2 Analyse durch Bestimmung der Basensequenz

Um die Aussagekraft der unspezifischen Ergebnisse der Hybridisierungen zu überprüfen wurden einige ausgewählte rekombinante Plasmide nach der Dideoxy-Methode (Sanger et al., 1975) ansequenziert.

Die ermittelten Sequenzen zeigten zwar eine für GBS beschriebene A/T reiche Basenzusammensetzung, die meisten der Sequenzen ließen sich jedoch nicht in eine der CAMP-Proteinsequenz homologe Proteinsequenz übersetzen.

Bei der Analyse eines 195 bp.-Fragmentes aus dem Klon KLN019 ergab sich eine lesbare Sequenz von 163 bp. Länge, deren Peptidsequenz im Leseraster 1 zu 83% mit der von Fehrenbach et al. ermittelten CAMP-Proteinsequenz übereinstimmt. Insbesondere zu den Aminosäuren 121 bis 164 des C-terminalen Endes der CAMP-Faktor-Sequenz fand sich eine 100% Homologie.

3.9 Klonierung und Sequenzierung des *cbf*-Gens mit Hilfe der "inverted PCR"

Aufbauend auf der aus dem Klon KLN019 ermittelten Teilsequenz wurde die weitere Klonierung und Sequenzierung des *cbf*-Gens mit Hilfe der "inverted-PCR" durchgeführt.

Diese Methode dient zur Amplifikation von Genbereichen die direkt an bekannte DNA-Sequenzen angrenzen (Kapitel 2.2.14.2).

Die Anwendung dieser Methode war notwendig, da keine Genombank eines Gruppe B Streptokokken-Stammes (R 268) existierte, aus der heraus mit Hilfe der bekannten Teilsequenz die vollständige *cbf*-Sequenz hätte ermittelt werden können.

Als Primer für die inverted-PCR dienten die aus dem bekannten Fragment abgeleiteten spezifischen Primer CAMP 1 und CAMP 2 (siehe Tabelle 3-4). Zur Detektion wurde die degenerierte CAMP III-Sonde verwendet.

Nach den Ergebnissen der Vorexperimente (Kapitel 3.5) mit degenerierten Sonden war die Anwesenheit einer *Hind*III-Schnittstelle innerhalb des CAMP-Gens zu vermuten. Es kamen von den untersuchten Restriktionsendonukleasen nur *Eco*RI und *Xba*I zur Verwendung in der "inverted PCR" in Frage. Bei diesen Enzymen ist das CAMP tragende Fragment ca. 2,5 kB (bei *Eco*RI) resp. ca. 2,0 kB (bei *Xba*I) groß und lag damit in einem Bereich, der durch die "inverted-PCR" theoretisch gut amplifizierbar sein sollte. Die Unsicherheit der Fragmentgrößenbestimmung liegt hier allerdings im Bereich von $\pm 0,5$ kB.

Sowohl bei den religierten *Eco*RI-Fragmenten als auch bei den religierten *Xba*I-Fragmenten fanden sich nach der PCR-Reaktion mehrere amplifizierte Fragmente. Von diesen hybridisierten jeweils ein Fragment aus der *Eco*RI-PCR (0,6 kB) und ein Fragment aus der

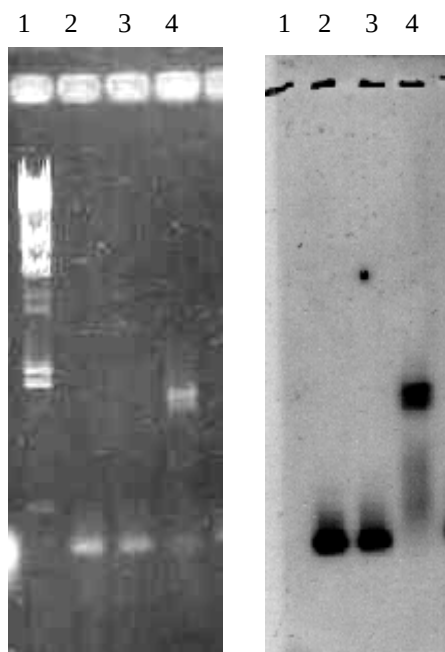


Abbildung 3-6:

Linke Seite:

Agarosegel, EtBR-Färbung von Fragmenten der inverted-PCR.

Auftrag:

- 1 = *Hind*III geschnittene λ -DNA (Marker)
- 2 = Inverted-PCR an mit *Eco*RI geschnittenem und religiertem Template.
- 3 = Inverted PCR-Produkt an mit *Eco*RI geschnittenem und religiertem Template.
- 4 = Inverted PCR-Produkt an mit *Xba*I geschnittenem und religiertem Template

Rechte Seite:

Southern Blot des links abgebildeten Gels, Hybridisierung mit CAMP III-Sonde, Detektion durch Chemolumineszenz, Auftrag wie linke Seite.

*Xba*I-PCR (1,8 kB) mit der CAMP III-Sonde (Abb. 3-6).

Diese Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen isoliert und nach Aufreinigung über Ionenaustausch-chromatographische Säulen (NACS-Säulen,

Fa. Gibco BRL) zur Subklonierung in pUC19 gebracht. Die Sequenzierung mit den Standard-Sequenzierprimern zeigte das Vorhandensein einer *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des CAMP-Gens: die *cbf*-homologe Sequenz des 0,6 kB-Fragment war unvollständig und durch eine erneute *EcoRI*-Schnittstelle begrenzt. Die Sequenzierung des CAMP-Gens wurde deshalb ausschließlich in dem mit *XbaI* geschnittenen Fragment weitergeführt. Die "inverted-PCR" und die darauffolgenden Sequenzierungsarbeiten wurden an der genomischen DNA des Ausgangstammes R268 durchgeführt.

3.9.1 Sequenzierung des *cbf*-Gens

Bei der Sequenzierung des *cbf*-Gens wurden wieder aus den jeweils neu gelesenen Sequenzen die folgenden Sequenzierprimer festgelegt. Lücken zwischen den neu ermittelten Sequenzen sowie interessante Genbereiche wurden durch spezifische PCR-Reaktionen an genomischer DNA und anschließender Direktsequenzierung der PCR-Produkte aufgefüllt. Die als PCR-Primer und zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Position (bp)	T _m (°C)
CAMP 1	TTG TTC TAA TGC CTT TAC ATC G	943 - 922	49,9
CAMP 2	AAA ACC AAC TGA TAG AGC TAC CAT	967 - 990	50,4
CAMP 3	TGA TTC AAT TAA AGC TCA AG	898 - 917	42,4
CAMP 4	TTG AGT TGA AAA AGT GAT TGC	805 - 785	47,3
CAMP 5	TCG TGT AGA AGC CTT AAC AGA	754 - 774	47,1
CAMP 6	TGT TAA GGC TTC TAC ACG ACT AC	772 - 749	48,0
CAMP 7	AAT CTG GAA TAC ACG CTT TAC TA	1018 - 1040	47,7
CAMP 8	CAA CTC CAC AAG TGG TAA ATC	534 - 554	46,3
CAMP 9	TGC TGG GCT TGA TTA TTA ATC	582 - 564	47,4
CAMP 10	CAT TAC AAG CAG CAC TTC A	1170 - 1188	46,7
CAMP 11	ATG CTG TTT GAA GTG CTG C	1196 - 1178	48,5
CAMP 12	GGC CCA TGT TGG TAT CTT AC	379 - 360	48,6
CAMP 13	ATC GTT ATG GTT TTT ACA TGA	183 - 203	44,4
CLON 1	AGG AGG AAA TTT ATT ATG AAC G	422 - 443	47,1
CLON 2	TTA TTT TAA TGC TGT TTG AAG TG	1204 - 1182	46,9
CLON 3	TCT ATT GGT AGT CGT GTA GAA G	743 - 764	43,5
CLON 4	CTT AGT TAT CCC AAA ATC AGG A	919 - 958	47,7

Tabelle 3-4: Zur Sequenzierung verwendete Primer. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die dargestellte Sequenz. Die angegebene T_m wurde mit Hilfe des OLIGO-Programms errechnet.

Um mögliche Sequenzierungsfehler zu eliminieren wurde nach Abschluß der Sequenzierung der inverted-PCR Produkte der gesamte Genbereich mit den Primern CAMP 13 und CLON 2 in einem Stück aus genomischer DNA amplifiziert und erneut mit den vorhandenen Primern sequenziert. Es ergaben sich keine Sequenzunterschiede zwischen der vom *Xba*I-Fragment ermittelten Sequenz und der von der genomischen DNA gelesenen Sequenz. Die ermittelte Basensequenz ist in Abbildung 3-7, gemeinsam mit der abgeleiteten Proteinsequenz dargestellt.

Der sequenzierte Bereich von 1,6 kB zeigte in der Basenzusammensetzung die für Streptokokken typische Häufung von Adenin und Thymin. Er enthält zwei offene Leseraster, von denen das größere (bp. 437-1201) für ein Protein von 255 Aminosäuren kodiert, welches bis auf 29 zusätzliche N-terminale Aminosäuren und zwei weitere Aminosäuren mit der von Rühlmann et al. veröffentlichten Sequenz identisch ist und daher dem *cbf*-Genlokus entspricht.

3.9.2 Analyse der *cbf*-Aminosäuren-Sequenz

Die 29 N-terminalen Aminosäuren, welche von der bereits veröffentlichten Proteinsequenz abweichen, entsprechen in ihrer Struktur und Zusammensetzung einer Signalpeptidsequenz, wie sie bei vielen von Streptokokken in den Kulturüberstand sezernierten Proteinen gefunden wird. Diese Signalpeptide werden normalerweise vor der Ausscheidung der Proteine abgespalten. Eine solche potentielle Spaltungsstelle findet sich hinter einer typischen Aminosäuresequenz Glu-Val-His-Ala↓- (EVHA-), entsprechend dem N-Terminus der im Kulturüberstand gefundenen Proteinform. Ohne diese Signalsequenz zeigt das CAMP-Protein von R268 eine 99%ige Übereinstimmung mit der bereits veröffentlichten Sequenz. Die verbleibenden Sequenzunterschiede in der Aminosäuresequenz sind der Einbau eines Prolin-Rests an Position 95 an Stelle von Serin (Iminogruppe an Stelle einer neutralen Seitengruppe) sowie der Einbau von Threonin an Stelle von Alanin (neutrale AS an Stelle einer aliphatischen AS) an Position 126. Diese Sequenzunterschiede sind nicht zwangsläufig die Folge von Mutationen gegenüber anderen Stämmen, es kann sich auch um Fehler bei der Sequenzbestimmung oder um allgemein variable Positionen innerhalb des Proteins handeln.

3.9.2.1 Analyse der *cbf*- Nukleinsäuresequenz

Upstream vom *cbf*-Gen finden sich Sequenzbereiche, die Sequenzhomologien zu typischen Konsensus-Sequenzen zur Transkriptionsinitiation bei Prokaryonten (-10 bp- und -35 bp-Boxen) aufweisen. Die Sequenzen der -35 Boxen bei Streptokokken-Promotoren vom σ -70-Typ weichen häufig von den bekannten *E.coli*-Sequenzen ab. So weisen die ersten drei

Positionen der Streptokokken -35-Box TTT an Stelle von TTG bei der Konsensus -35-Box auf. Auch in den Positionen 3-6 der -35-Box unterscheidet sich die Basenabfolge bei Streptokokken von der entsprechenden *E. coli*-Sequenz. Daher ist die hier gefundene Sequenz (Pos. 163-168) TTTATA typisch für eine -35-Box von Streptokokken und weniger für die von *E. coli*. Auch die Sequenz der vermuteten TATA-Box in -10 bp.-Position (Pos. 188-193) zum Transkriptionsstartpunkt weicht von der typischen *E. coli* Konsensus-Sequenz ab (TATGGT an Stelle von TATAAT). Der Startpunkt der Transkription, die +1-Position, würde damit auf das Adenin an Position 200 fallen.

Die vermutete Ribosomenbindungsstelle für die Translation, die Shine-Dalgrano-Box (Pos.482-487), entspricht in Lage (12 bp. oberhalb des Startcodons) und Basenzusammensetzung (AGGAGG) weitgehend den aus *E. coli* bekannten Konsensus-Sequenzen (Abbildung 3-7). Im Bereich zwischen dem 3'-Ende des *cbf*-Gens und dem folgenden offenen Leseraster gibt es zwei Sequenzabschnitte mit einer "Inverted-Repeat"-Struktur und dadurch potentielle Bereiche zur Schleifenbildung (Pos.1195 bis 1212 und Pos. 1331 bis 1346) als Sekundärstruktur ("stem loops"), gefolgt von mehreren Thyminresten. Diese beiden Sequenzabschnitte könnten die Funktion von Transkriptions-Terminationssequenzen haben und das Ende des mRNA-Transkripts festlegen. Der vordere dieser beiden Bereiche (Pos. 1195-1212) dient durch die relativ große Anzahl von Thymin-Residuen in Folge (5 in direkter Folge) mit etwas größerer Wahrscheinlichkeit als Faktor-*Rho*-unabhängiger Endpunkt der Transkription.

Sequenzhomologien und damit eine mögliche Funktion für das zweite in dem Genomabschnitt gefundene offene Leseraster (bp. 1337-1586) ließen sich nicht nachweisen. Anhand von Sequenzhomologien mit der *E.coli*-Konsensus-Sequenz läßt sich eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (Pos. 1362-1366) identifizieren. Ob dieses Leseraster in vivo aktiv ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

10	20	30	40	50	60
AAACAGCGAG	TGGAATAATG	ATTTTATAGTA	TGTTTTTGGG	CATAATCGGA	CGATTTTATC
TAAATAGTA	CGCTTCTTAT	TAAATTTATT	TTTTAAGGGC	AACATTAGGC	TAATCTATTT
GATAAAAAATA	GTGATAAGTA	GAAATTTTCT	AAAATATTTA	GATTTATATA	AGGTGGTAAA
TTATCGTTAT	GGTTTTTACA	TGAAAAATCTA	AATTAAATTA	TCAGAAATTA	ACAAAAAGGA
TGGCGCAAGT	ATATTATAGC	AAAATGATAA	TATTAGTTTT	ATGAAAAAAA	TGCAGTTTAT
TTGTAATAAT	GTAAATATA	GGGGAAAAAGA	AAGCGCTTTG	ACGACCTTTT	GGACAAGTAG
TAAGATACCA	ACATGGGCCC	TGTAAATTAA	AAATACTGCA	GTAGAAGTGA	TTTTAGTTTA
AAGGAGGAAA	TTTATT ATGA	ACGTTACACA	TATGATGTAT	CTATCTGGAA	CTCTAGTGGC
	M N V T H	M M Y	L S G T L V A		
TGGTGCATTG	TTATTTTCAC	CAGCTGTATT	AGAAGTACAT	GCTGATCAAG	TGACAACCTCC
G A L	L F S	P A V L	E V H	A X D	Q V T T P
ACAAGTGGTA	AATCATGTAA	ATAGTAATAA	TCAAGCCCAG	CAAATGGCTC	AAAAGCTTGA
Q V V	N H V	N S N N	Q A Q	Q M A	Q K L D
TCAAGATAGC	ATTCAAGTTGA	GAAATATCAA	AGATAATGTT	CAGGGAACAG	ATTATGAAAA
Q D S	I Q L	R N I K	D N V	Q G T	D Y E K
ACCGGTAAAT	GAGGCTATTA	CTAGCGTGGA	AAAATTAAAG	ACTTCATTGC	GTGCCAACCC
P V N	E A I T	S V E	K L K	T S L R	A N P
TGAGACAGTT	TATGATTTGA	ATTCTATTGG	TAGTCGTGTA	GAAGCCTTAA	CAGATGTGAT
E T V	Y D L N	S I G	S R V E	A L T	D V I
TGAAGCAATC	ACTTTTTCAA	CTCAACATTT	AACAAATAAG	GTTAGTCAAG	CAAATATTGA
E A I T	F S T	Q H L	T N K V	S Q A	N I D D
TATGGGATTT	GGGATAACTA	AGCTAGTTAT	TCGCATTTTA	GATCCATTTG	CTTCAGTTGA
M G G	G I T	K L V I	R I L	D P F	A S V D
TTCAATTAAA	GCTCAAGTTA	ACGATGTAAA	GGCATTAGAA	CAAAAAGTTT	TAAC TTATCC
S I K	A Q V	N D V K	A L E	Q K V	L T Y P
TGATTTAAAA	CCAAGTATA	GAGCTACCAT	CTATACAAAA	TCAAACTTGA	ATAAGGAAAT
D L K	P T D	R A T I	Y T K	S K L	D K E I
CTGGAATACA	CGCTTTACTA	GAGATAAAAA	AGTACTTAAC	GTCAAAGAAT	TTAAAGTTTA
W N T	R F T	R D K K	V L N	V K E	F K V Y
CAATACTTTA	AATAAAGCAA	TCACACATGC	TGTTGGAGTT	CAGTTGAATC	CAAATGTTAC
N T L	N K A	I T H A	V G V	Q L N	P N V T
GGTACAACAA	GTTGATCAAG	AGATTGTAAC	ATTACAAGCA	GCACTTCAAA	CAGCATTTAA
V Q Q	V D Q	E I V T	L Q A	A L Q	T A L K
ATAATATTTG	TATTTTTCGT	GTGATGCTGT	CGACTTCGTG	ATTTTGTACT	ACCATGATTG
TTATGATTAA	AAGATTTACG	ACAATAGTCA	TAATAGTAGA	ACGATGTCAC	CATTTTAAAT
AATAAAGTGA	TTAGTCATTT	GAATAAATTT	GCCAAGTATC	AAAGGAAATA	AAGATT ATGA
CTAAAAAGAT	AACTGTTGTA	GCATTAGAAA	CATTGATTGC	CCAGCATAAT	AATATCCATT
TGATAGACGT	TCGTGAAGAG	CATGAGTATC	GTGGAGGGCA	TATTCCAGGT	GCGATAAATC
TTCTTTTGAG	TAAGTCAGTC	ATAAGTTTGA	ACAGTTTAGA	TAAAATAAGG	AATATTATCT
TGTTGGCAAC	GAGGGGGAAG	ATCTATT TAGA	GCAT		

Gesamtsequenz: 1594 BP; 591 A; 210 C; 291 G; 502 T;

Abbildung 3-7: DNA-Basensequenz der *cbf*-Genregion.

Abbildung 3-7 (Seite 47)

Die vermuteten **-35** und **-10** Sequenzen sind fett gedruckt; die Ribosomenbindungsstelle ist unterstrichen, das **Start-** und das **Stopcodon** sind fett und unterstrichen dargestellt. Gleiches gilt auch für die **-10 bp.-Sequenz** sowie das Start- und Stopcodon des anschließenden Leserahmens. Die entsprechenden Aminosäuren sind unter die Sequenz gesetzt. Die vermutete Abspaltungsstelle des Signalpeptids ist durch ✂ gekennzeichnet. Von der veröffentlichten Sequenz abweichende Aminosäuren sind fett gedruckt

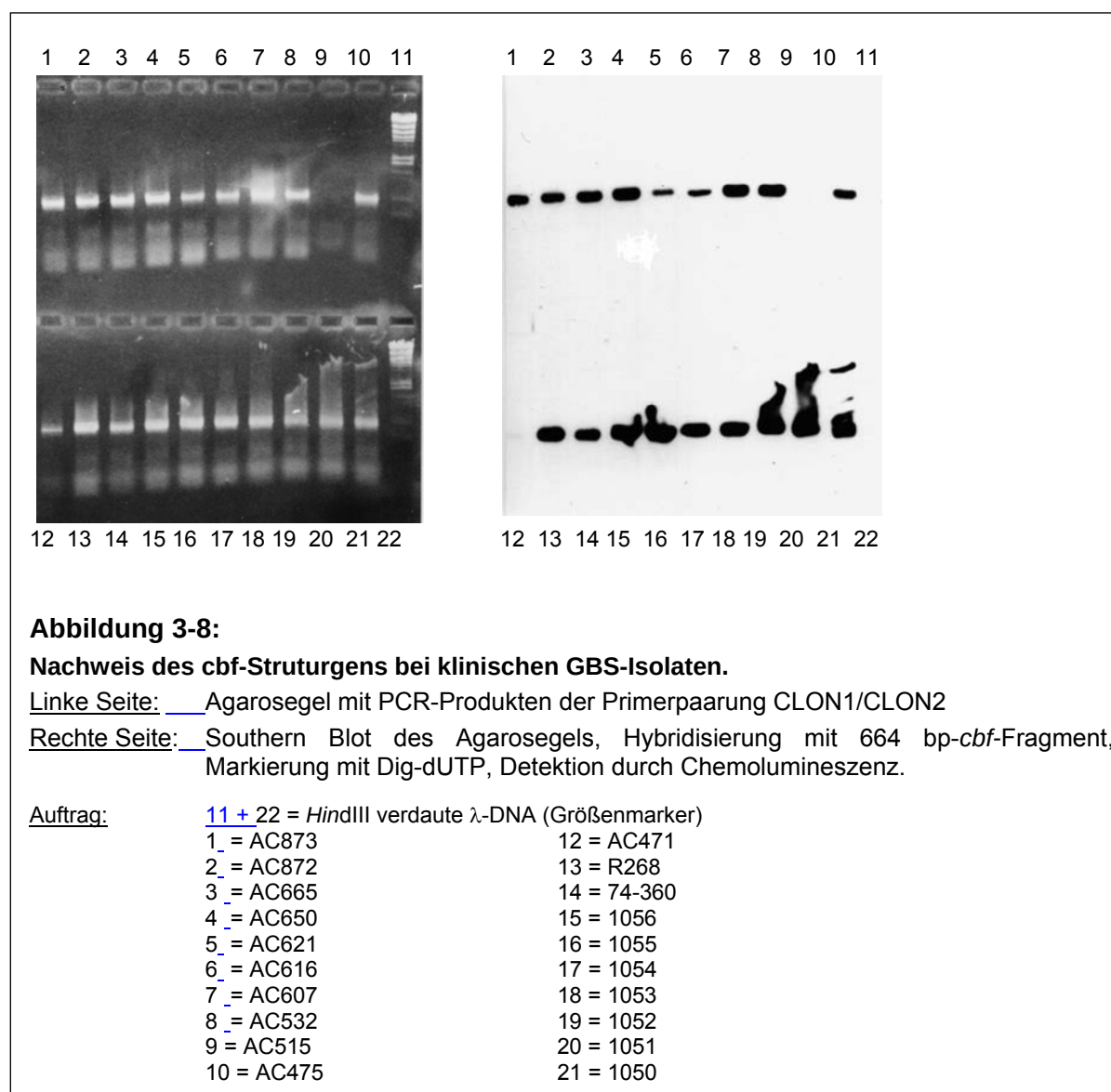
3.10 Untersuchungen zum Auftreten bei anderen Gruppe B Streptokokken

Da im klinischen Alltag Stämme gefunden werden, die keine Kohämolysen mit dem β -Toxin der Staphylokokken zeigen oder bei denen diese in unterschiedlich ausgeprägter Form auftritt, sollte die Verbreitung des *cbf*-Gens in GBS sowie mögliche Genvariationen durch Hybridisierungsexperimente untersucht werden. Hierzu wurde von 19 klinischen Isolaten die chromosomale DNA präpariert und anschließend das gesamte *cbf*-Strukturgen durch PCR mit den Primern CLON1 und CLON2 amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte in Agarosegelen wurde die DNA geblottet und hybridisiert (Abbildung 3-8). Als Sonde diente ein unter Verwendung von chromosomaler DNA des Stammes R268 aus den Primern CAMP 8 und CAMP 11 generiertes PCR-Fragment. Dieses 664 bp.-Fragment wurde durch Einbau von Digoxigenin-dUTP in der PCR-Reaktion direkt markiert. Es umfaßte bis auf den für das Signalpeptid kodierenden Bereich praktisch das gesamte *cbf*-Strukturgen. Die Hybridisierung wurde bei einer stringenten Hybridisierungstemperatur von 68 °C durchgeführt.

Bei allen von uns untersuchten Stämmen ließ sich das gesuchte Genfragment nachweisen. Es hybridisierte bei der mit *Xba*I geschnittenen DNA mit einem 2,4 kB großen Fragment, bei der mit *Eco*RI geschnittenen DNA zeigten sich zwei Fragmente von 1,4 bzw. 1,7 kB Größe die jeweils mit der Sonde hybridisierten. Unter den gewählten Bedingungen muß von einer mindestens 95%igen Sequenzhomologie für den getesteten Bereich ausgegangen werden. Größere Mutationen oder Deletionen des *cbf*-Strukturgens ließen sich damit bei keinem untersuchten Stamm nachweisen, auch der phänotypisch CAMP-negativen Stamm 74-360 scheint ein reguläres *cbf*-Strukturgen zu besitzen.

3.11 Sequenzvergleich mit CAMP-negativen Gruppe B Streptokokken

Da auch phänotypisch CAMP-negative Stämme ein offenbar reguläres *cbf*-Strukturgen besaßen, sollte stellvertretend für die entdeckten, in der CAMP-Reaktion varianten Stämme die *cbf*-Genregion des CAMP-Reaktions-negativen Stammes 74-360 vollständig sequenziert werden. In dieser Sequenz sollte nach umschriebenen, geringfügigen Mutationen gefahndet werden. Hierzu wurden die für die Sequenzierung der R268-*cbf*-Genregion verwendeten Primer (Siehe Tabelle 3-4) genutzt. Es wurden PCR-Produkte aus "Inverted-PCR" Ansätzen sowie von PCR-Reaktionen aus chromosomaler DNA zur



Direktsequenzierung verwendet.

Die ermittelte Sequenz war zu 89,5% homolog zu der bei R268 bestimmten Sequenz. So waren die Shine-Dalgarno-Box, das Start-Kodon und die ersten 19 Kodons des *cbf*-Gens des Stammes 74-360 mit denen des Stammes R268 identisch oder wiesen unbedeutende

R 268	-	AAACAGCGAGTGGAATAATGATTTTTAGTATGTTTTGGGCATAATCGGA	-50
74-360	-	AAACAGCGAGTGGAATAATGATTTTTAGTATGTTTTGGGCATAATCGGA	-50
R 268	-	CGATTTTATCTAAAATAGTACGCTTCTTATTAAATTTATTTTTTAAGGGC	-100
74-360	-	CGATTTTATCTAAAATAGTACGCTTCTTATTAAATTTATTTTTTAAGGGC	-100
R 268	-	AACATTAGGCTAATCTATTTGATAAAAAATAGTGATAAGTAGAAATTTTCT	-150
74-360	-	AACATTAGGCTAATCTATTTGATAAAAAATAGTGATAAGTAGAAATTTTCT	-150
R 268	-	AAAATATTTAGAT TTTATATA AAGGTGGTAAATTATCGT TATGG TTTTTAC	-199
74-360	-	AAAATATTTAGAT TTTATATA AAGGTGGTAAATTATCGT TATGGCT TTTTTAC	-200
R 268	-	ATGAAAATCTAAATTAAATTATCAGAAATTAACAAAAGGATAGGCGCAAG	-249
74-360	-	TTG AAAATCTAAATTAAATTATCAGAAATTAACAAAAGGATTGGCGCAAG	-250
R 268	-	TATATTATAGCAAAATGATAATATTAGTTTTATGAAAAAAATGCAGTTTA	-299
74-360	-	TATATTATAGCAAAATGATAATATTAGTTTTATGAAAAAAATGCAGTTTA	-300
R 268	-	TTTGTAATAATGTTAAATATAGGGGAAAAGAAAGCGCTTTGACGACCTTT	-349
74-360	-	TTTGTAATAATGTTAAATATAGGGGAAAAGAAAGCGCTC GACGACCTTT	-349
R 268	-	TGGACAAGTAGTAAGATACCAACATGGGCCCTGTAAATTAAAAATACTGC	-399
74-360	-	TGGACAAGTAGTAAGATACCAACATGGGCCCTGTAAATTAAAAATACTGC	-399
R 268	-	AGTAGAAGTGATTTTAGTTTTAA AGGAGG AAATTTATT ATGA ACGTTACAC	-449
74-360	-	AGTAAAAGTGATTTTAGTTTTAA AGGAGG AAATTCATT ATGA ACGTTAAAC	-449
R 268	-	ATATGATGTATCTATCTGGAACCTAGTGGCTGGTGCATTGTTATTTTCA	-499
74-360	-	ATATGATGTATCTATCTGGAACCTAGTGGCTGGTGCATTGTTATTTCCA	-499
R 268	-	CCAGCTGTATTAGAAGTACATGCTGATCAAGTGACAACTCCACAAGTGGT	-549
74-360	-	CCAGCTGTATTAGAAGTACATGCTGATCAAGTGACAACTCCACAAGTGGT	-549
R 268	-	AAATCATGTAAATAGTAATAATCAAGCCCAGCAAATGGCTCAAAAGCTTG	-599
74-360	-	AAATCATGTAAACAGTAATAATCAAGCCCAGCAAATGGCTCAAAAGCTTG	-599

Abbildung 3-9: Sequenzvergleich der Promotorregionen von Stamm R268 und 74-360.

Übereinstimmende Basen sind durch "|" verbunden, funktionswichtige Bereiche des Promotors sind fett gedruckt. Das Startcodon des Strukturgens ist fett und unterstrichen dargestellt.

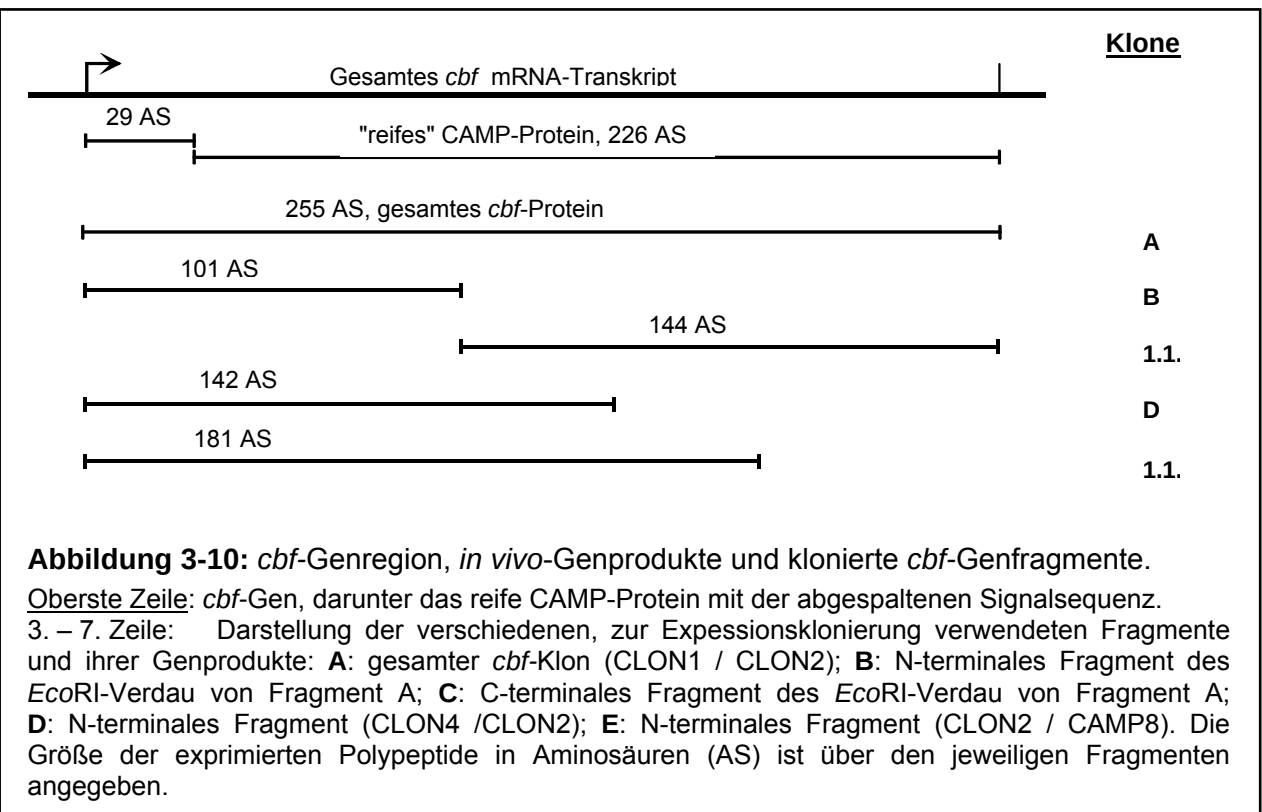
Abweichungen auf. Dagegen fanden sich in der postulierten Promotorregion des *cbf*-Gens des Stammes 74-360 einige womöglich entscheidende Veränderungen: die -10 Box wich

durch eine Insertion deutlich von der des Stammes R268 ab, zudem war die +1-Position durch einen Basenaustausch (Adenin zu Thymin) betroffen. Die übrigen nachgewiesenen Punktmutationen und die Insertion einer weiteren Base betrafen keine nachweisbar funktionswichtigen Bereiche mehr. Da in einer weiteren Arbeit (Podbielski et al. 1994),

gezeigt werden konnte, daß bei dem Stamm 74-360 kein *cbf*-mRNA-Transkript auftritt, läßt sich das CAMP-Reaktion negative Verhalten des Stammes 74-360 mit den hier gezeigten Mutationen im *cbf*-Genpromotor erklären.

3.12 Klonierung des *cbf*-Gens und einzelner *cbf*-Genfragmente in einen Expressionsvektor

Bei den bisherigen Experimenten zur Klonierung des *cbf*-Gens oder seiner Subfragmente liessen sich keine stabilen Klone etablieren. Eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgreiche Klonierung des vollständigen *cbf*-Gens in den pUC-Vektoren war die etwaige Instabilität der rekombinanten Plasmide durch die Expression des CAMP-Faktors mit möglicherweise negativer Wirkung auf die Zellmembran des *E. coli*-Wirtes. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde für weitere Klonierungen zur *cbf*-Genexpression ein temperaturinduzierbarer Expressionsvektor verwandt. Zur Klonierung in das pJLA-Expressionssystem wurde das komplette *cbf*-Gen ohne eigenen Promotor bzw. ein N-terminales (Aminosäuren 30 - 151) und ein C-terminales (Aminosäuren 111 - 255) *cbf*-Genfragment mit Hilfe von PCR amplifiziert.



Verwendete Primer:

Gesamtes *cbf*-Gen: CLON1/CLON2

N-terminales Fragment: CLON4/CLON2

C-terminales Fragment: Gesamtes *cbf*-Fragment, *EcoRI*-Verdau mit Schnittstelle an Pos. 742.

Zur Ligation in den Vektor wurden die PCR-Primer an ihren 5'-Enden mit *Bam*HI, *Sal*I oder *Eco*RI-Schnittstellen versehen.

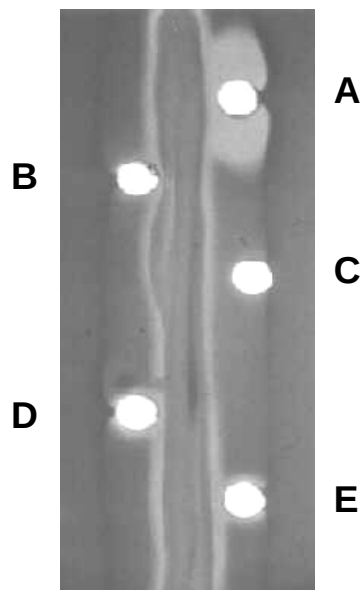
Nach Etablierung der rekombinanten Plasmide in einem *E. coli*-Dh5 α -Wirt wurde die Identität und Vollständigkeit der klonierten Fragmente durch Southern-Blot Hybridisierungen sowie durch PCR-Experimente mit den ursprünglichen Primern bestätigt.

3.13 Aktivitätstestung des rekombinanten *cbf*-Proteins und der *cbf*-Proteinfragmente im Ko-Hämolyse-Test

Die rekombinanten *E. coli*-Klone wurden in Kohämolyse-Tests auf die Expression des rekombinanten CAMP-Faktors und dessen Funktion untersucht. Da nicht gesichert war, ob der rekombinante komplette CAMP-Faktor vom *E. coli* Wirtsbakterium sezerniert wurde und andererseits aufgrund der Klonierungsstrategie der CAMP-Faktorfragmente eine Sekretion durch den *E. coli* unmöglich war, wurden alle Wirtsklone nach Temperaturinduktion durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 0,5 ml Aliquote der Bakterienlysate wurden wie in Kapitel 2.2.3.3. und 2.2.3.4. beschrieben auf ihre kohämolysische Aktivität gemessen. Dabei wies nur der vollständige rekombinante CAMP-Faktor eine nachweisbare kohämolysische Aktivität auf (Abbildung 3-11).

Klon	Peptidgröße (AS)	Fragmentlänge	Kohämolyse
A	255	Komplettes <i>cbf</i> -Gen	Pos.
B	101	N-terminal	Neg.
C	144	C-terminal	Neg.
D	142	N-terminal	Neg.
E	181	N-terminal	Neg.

Tabelle 3-5: Hämolytische Aktivität der *cbf*-Subklone

**Abbildung 3-11:**

Kohämolytische Aktivität der Subklone im Diffusionstest.

In der Mitte wurde *S. aureus* ATCC10832 in einer Linie aufgeimpft und über Nacht bebrütet. In die ausgestanzten Löcher wurden aliquotierte Sonikate der einzelnen Subklone A – E (siehe Abb. 3-10 und Tab. 3-5) eingefüllt.

Die Hämolyse wurde nach einer erneuten Inkubation von 6 Std. durch Nachweis des charakteristischen hellen Hofes in der Diffusionszone des *S.aureus* β -Toxins nachgewiesen.

4 Diskussion

Untersuchungen zu Virulenzfaktoren der GBS konzentrierten sich lange Zeit auf die Kapselstruktur und -synthese, da schon seit längerem Hinweise auf eine entsprechende Funktion der Kapsel vorlagen (Marques et al., 1992, Rubens et al., 1987 und Wessels et al., 1989). Die Kenntnisse über weitere Virulenzfaktoren und ihre Rolle im Krankheitsprozess sind im Gegensatz zum bisher erlangten Wissen über die Funktion der Kapsel noch gering. Bisher sind als Virulenzfaktoren das C α -Protein (Michel et al., 1992), das Rib-Protein (Stalhammar-Carlemalm et al., 1993), die Komplement inaktivierende (Cleary et al., 1992, Bohnsack et al., 1993, Takahashi et al., 1995 und 1999) und Fibronektin bindende (Beckmann et al., 2002 und Chend et al., 2002) C5a-Peptidase, der an der Fibronektin-Bindung beteiligte Glutamin-Transporter glnQ (Tamura et al., 2002), das Hämolysin (Spellerberg et al., 1999, Pritzlaff et al., 2001, Nizet, 2002), ein weiteres IgA-bindendes Protein (Heden et al., 1991) sowie die Fibrinogen bindende Adhäsine FbsA und FbsB (Schubert et al., 2002 und Gutekunst et al., 2004) molekulargenetisch charakterisiert und diskutiert worden.

Weitere potentielle Virulenzfaktoren sind bekannt, ihre Charakterisierung auf molekularer Ebene steht jedoch noch aus. Zu diesen gehört das R-Protein (Wibawan et al., 1990), die GBS-Hyaluronidase (Pritchard et al., 1993), verschiedene Opazitätsfaktoren (Pincus et al., 1993) sowie ein pyrogenes Toxin (Schlievert et al., 1993).

Unter den potentiellen Virulenzfaktoren ist der CAMP-Faktor (Christie et al., 1944) am längsten bekannt und beschrieben. Seine starke kohämolytische Eigenschaft in Anwesenheit vom β -Toxin der Staphylokokken oder anderer Sphingomyelinasen und Phospholipasen ist seit ca. 20 Jahren bekannt und wird auch als diagnostisches Kriterium in der mikrobiologischen Diagnostik genutzt.

Bernheimer konnte 1979 die Proteinnatur des CAMP-Faktors belegen und stellte ein Modell für den biochemischen Mechanismus der von ihm vermittelten Kohämolyse vor. Danach handelt es sich bei dem CAMP-Phänomen um eine nicht-enzymatische Lyse, die durch Bindung des CAMP-Faktors an ceramidhaltige Doppelmembranen hervorgerufen wird. Um jedoch tatsächlich eine Zerstörung der Membran hervorzurufen, müssen vorher in der Membran enthaltende Sphingomyeline zu Ceramiden umgewandelt werden. Dies kann z.B. durch das β -Toxin von *S. aureus* oder durch andere Sphingomyelinasen und Phospholipasen geschehen, wie sich in entsprechenden *in vitro* Testsystemen zeigen ließ.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten die Erkenntnisse zur Funktion und Regulation dieses am längsten bekannten Virulenzfaktors aus GBS erweitert und auf molekularer Ebene vertieft werden. Durch Untersuchungen zum weiteren Verständnis der molekularen und genetischen Funktion des CAMP-Faktors sollten ggf. Hinweise auf dessen Rolle in der GBS-Infektion gefunden werden.

4.1 Analyse des Plasmids pCO63

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Plasmid pCO63 sollte laut Voruntersuchungen ein den CAMP-Faktor kodierendes DNA-Fragment enthalten (Schneewind et al., 1988). In allen Kohämolysenmessungen konnte weder bei Wirtsstämmen mit dem pCO63 Plasmid noch bei Stämmen mit subklonierten Fragmenten des Gesamtinserts eine Kohämolysen mit dem β -Toxin von *S. aureus* nachgewiesen werden. Eine schwache, unspezifische Hämolyse, unabhängig von der Anwesenheit von β -Toxin und der Zusammensetzung des Lysats war bei der Verwendung größerer Lysatmengen und -konzentrationen nachweisbar. Die Sequenzierung des gesamten rekombinanten Fragments aus pCO63 erbrachte keinen Hinweis auf die Anwesenheit des *cbf*-Gens. Vielmehr zeigte der Sequenzvergleich, daß dieses Fragment die Sequenz des CDP-Diglyzeridhydrolase-Gens aus *E. coli* enthielt. Daraus war zu folgern, daß das rekombinante Fragment aus pCO63 ein Segment der genomischen *E. coli* DNA darstellte.

Schneewind et al. wiesen 1988 die Anwesenheit des CAMP-Faktor-Gens innerhalb der rekombinanten pCO-Fragmente nach, indem sie eine schwache β -Hämolyse der rekombinanten Klone fanden und in einer Western-Blot Analyse aus Lysaten der *E. coli*-Wirt mit polyklonalem Kaninchen-Anti-CAMP-Serum eine Bande in der erwarteten Größe nachweisen konnten.

Die Untersuchungen von Schneewind et al. wurden jedoch größtenteils nicht mit dem Plasmid pCO63, sondern mit dessen Vorläufern, den Plasmiden pCO61 und pCO62 durchgeführt. Es besteht also die Möglichkeit, daß das ursprüngliche, *cbf*-Gen enthaltende Fragment im Rahmen der Subklonierung verloren ging und durch ein Fragment genomischer *E. coli*-DNA von gleicher Größe und in identischem Abstand zu den zur Klonierung benutzten Schnittstellen ersetzt wurde.

Das im rekombinanten pCO63-Fragment enthaltene CDP-Diglyzerid-Hydrolase-Gen kodiert für ein Enzym, welches in den Abbau von Phospholipid-Doppelmembranen involviert ist. Dieses Enzym kann unter bestimmten Bedingungen (Vorbehandlung und Alter der Erythrozyten, Kälte, etc.) eine hämolytische Wirkung auf die Erythrozytenmembran aufweisen und damit zu schwachen hämolytischen oder kohämolytischen Effekten führen.

Dies kann die in der Arbeit von Schneewind 1988 beschriebene und auch in dieser Arbeit beobachtete hämolytische Aktivität von *E. coli*-Wirten, die rekombinante Fragmente der pCO-Reihe tragen, erklären. Eine solche Eigenschaft kann auch zu einer Verwechslung mit dem CAMP-Phänomen führen.

Der Größenunterschied zwischen den beiden Proteinen ist nicht ausgeprägt (CAMP-Faktor: ca. 26 kDa; CDP-Hydrolase: 28 kDa), so daß eine Verwechslung in einem Western-Immunoblot denkbar wäre. Da die CDP-Hydrolase als membranständiges *E. coli*-Protein in Lysaten mit großer Wahrscheinlichkeit vorhanden ist, muß auch eine Sensibilisierung von Versuchskaninchen gegenüber diesem Protein als wahrscheinlich angenommen werden. Dies könnte die Detektion des vermeintlichen rekombinanten CAMP-Faktors aus dem pCO63-Plasmid im Western-Blot erklären.

Ein zwingender Beweis, daß es sich bei dem in pCO63 klonierten Gen um das *cbf*-Gen und in der Folge um dessen Genprodukt handelt, ist daher in der Arbeit von Schneewind nicht enthalten. Unglücklicherweise unterblieb in den ursprünglichen Arbeiten von Schneewind auch die Hybridisierung von pCO63 mit genomischer DNA des Gruppe B-Streptokokken-Ausgangsstammes. Spätestens so wäre aufgefallen, daß das in pCO63 einklonierte Genfragment keine Gruppe B-Streptokokken-DNA enthält.

Zusammenfassend läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur noch feststellen, daß das Plasmid pCO63 das *cbf*-Gen aus GBS nicht enthielt. Wie es zu dieser Situation kam, ist im nachhinein nicht mehr zu klären.

4.2 Struktur des *cbf*-Gens und Eigenschaften des rekombinanten CAMP-Faktors

Die von Schneewind et al. beschriebenen Schwierigkeiten bei der Klonierung des CAMP-Faktors in "High-copy-number" Plasmiden zeigte sich auch im Verlauf unserer Untersuchungen. Zwar gelang die Klonierung von *cbf*-Genfragmenten in pUC-Plasmide, bei keinem der etablierten pUC-Klone wurden jedoch Genfragmente kloniert, die zu einer Expression von funktionell aktivem CAMP-Faktor oder CAMP-Faktor-Fragmenten führten. Ebenfalls war in unseren Versuchen zur Etablierung einer *cbf*-gewichteten Genbank in pUC-Plasmiden die Klonierungseffizienz unzureichend; ob das an den klonierten Genfragmenten oder an methodischen Schwierigkeiten lag ist unklar.

Diese Resultate führten gemeinsam mit den Beobachtungen von Schneewind (1988) zur Verwendung eines temperaturabhängigen Expressionsvektors bei der Klonierung von funktionell wesentlichen Genabschnitten (pJILA).

Bei der Klonierung des gesamten *cbf*-Gens im pJILA-Plasmid und der nachfolgenden Expression des rekombinanten CAMP-Faktors nach thermischer Induktion zeigte sich ein Wachstumsstillstand der *E. coli*-Wirtsbakterien, sobald die Expression des *cbf*-Gens aktiviert wurde.

Derartige Effekte waren für keines der von uns klonierten Subfragmente des *cbf*-Gens zu beobachten. Die Beobachtungen zur Wirkung auf den gram-negativen Wirt deuten an, daß nur der vollständige CAMP-Faktor eine membran-aktive und damit ko-zytolytische Funktion aufweist. Offenbar wirkt der intakte CAMP-Faktor in höheren Konzentrationen inhibierend oder toxisch auf im Wachstum befindliche *E. coli*-Kulturen. Die hier vermutete toxische Wirkung des CAMP-Faktors auf Bakterienkulturen wird auch von Lang und Palmert (2003) in *E. coli*-Kulturen bestätigt, ihre Experimente zur CAMP-Faktor Expression in einem grampositiven Wirtsbakterium (*Bazillus subtilis*) führten ebenfalls zur Lyse der Wirtsbakterien nach Induktion der Expression. Damit ist von einer direkten Schädigung von grampositiven und gramnegativen Wirtsbakterien durch zytosolisch exprimierten CAMP-Faktor auszugehen.

Das könnte dadurch begründet sein, daß dieses potentiell Membran-destabilisierende Protein in GBS aktiv in den Kulturüberstand sezerniert wird. In *E. coli*- und *B. subtilis*-Zellen verbleibt es jedoch intrazellulär und/oder gelangt in den periplasmatischen Raum, da vermutlich der notwendige Transportmechanismus für die vollständige Sekretion fehlt. Inwieweit dieses Phänomen Hinweise auf mögliche Funktionen des CAMP-Faktors zur Beeinflussung konkurrierender Erreger geben kann, muss weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

Das beschriebene Phänomen kann als Hinweis auf eine komplexe Funktionsweise des CAMP-Faktors gewertet werden, wobei nach unseren Experimenten die Anwesenheit sowohl des C-terminalen als auch des N-terminalen Abschnittes für die vollständige biologische Funktion erforderlich ist. Daraus ließe sich auf eine aktive Membranbindungsstelle schließen, die durch sterische Faltung des Proteins aus N-terminalen und C-terminalen Anteilen der Sequenz zusammengesetzt wird. Weiter wäre eine komplizierte Tertiärstruktur denkbar, bei der ein Verlust einzelner Proteinabschnitte zu relevanten strukturellen Veränderungen und damit zum Verlust von Funktionen führt.

Die Erkenntnis, daß nur der vollständige CAMP-Faktor zur Ko-Hämolyse im Testsystem führte, widersprach der genauen Lokalisation der Proteinfunktionen (Fc-Bindung, Kohämolyse) innerhalb des CAMP-Faktors, wie sie Jürgens et al. 1987 beschrieben hatten. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Untersuchungen von Jürgens et al. (1987) und Rühlmann et al. (1988) könnte darauf

zurückzuführen sein, daß die vorgenannten Arbeiten den natürlichen CAMP-Faktor und dessen Spaltprodukte untersuchten, hier aber rekombinanter CAMP-Faktor und entsprechende Fragmente für die Experimente verwendet wurden. Im *E. coli*-Wirt könnte es zur Ausbildung einer andersartigen Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins kommen, die solche Funktionsunterschiede erklären könnte. Ähnliches wurde bereits für andere Proteine aus Streptokokken berichtet (Reda-Stevens et al., 1996).

Die Analyse der hier ermittelten Nukleinsäuresequenz ergab ein zur CAMP-Faktor Aminosäuresequenz (Rühlmann et al., 1988) hochhomologes Leseraster, welches ein um 29 N-terminale Aminosäuren größeres Protein kodiert. Diese Teilsequenz von 29 zusätzlichen Aminosäuren entspricht in ihrer Länge und Struktur einem typischen bakteriellen Signalpeptid (von Heijne, 1989). Insbesondere stimmte die durch das Modell vorhergesagte Spaltungsstelle mit dem N-Terminus des sequenzierten, reifen Proteins überein. Die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des reifen CAMP-Faktors stimmt zu 98% mit der von Rühlmann et al. veröffentlichten Sequenz überein.

Über die Bedeutung der beiden Abweichungen zu der von Rühlmann et al. veröffentlichten Aminosäuresequenz lassen sich nur sehr eingeschränkte Aussagen machen, da die betroffenen Genbereiche nicht bei einer ausreichenden Anzahl von klinischen Isolaten sequenziert wurden.

Der Sequenzunterschied an Position 126 wird, da es sich in beiden Fällen um nicht ausgeprägt polare Aminosäuren handelt wahrscheinlich keine funktionellen Auswirkungen haben. Die Einfügung von Prolin an Stelle von Serin an Position 95 könnte dagegen Auswirkungen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur haben, da Prolinreste häufig zu einer Abknickung in der Sekundärstruktur von Proteinen führen. Diese möglichen sterischen Unterschiede könnten z.B. für die etwas ausgeprägtere CAMP-Aktivität von R268 in semiquantitativen Tests verantwortlich sein. Auf diesen Ergebnissen aufbauende Arbeiten (Lang und Palmer, 2003) konnten in anderen Stämmen die hier beobachteten Sequenzunterschiede bislang nicht bestätigen, so dass es sich möglicherweise tatsächlich um eine Besonderheit des Stammes R268 handelt. Lang und Palmer konnten 2003 an rekombinantem CAMP-Faktor keine funktionelle Auswirkung der Verlängerung des N-Terminus durch Fusionsprotein-Reste nachweisen und schliessen daraus, dass dieser Teil des Moleküls für die Kohämolysen ohne Bedeutung ist. Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Klone ohne den N-Terminus zeigten jedoch keine kohämolytische Aktivität, was möglicherweise durch die Größe des fehlenden Proteinfragments erklärbar ist.

4.3 *cbf*-Gene in klinischen GBS-Isolaten

Die Untersuchungen von 20 klinischen Gruppe B-Streptokokken-Isolaten mit Hilfe von PCR und Southern Blot-Hybridisierungen belegten das Vorkommen des *cbf*-Genlokus in allen geprüften GBS-Stämmen, also auch in solchen, die phänotypisch eine negative CAMP-Reaktion aufweisen.

Mögliche Begründungen für diese Diskrepanz zwischen phänotypischen und genotypischen Befunden in diesen Stämmen waren, daß das *cbf*-Gen Punktmutationen im Sinne von Non-Sense-Kodons, Stop-Kodons, kleinere Deletionen oder Insertionen aufwies bzw. nur ungenügend exprimiert wurde.

Um diese Möglichkeiten näher zu untersuchen, wurde exemplarisch das *cbf*-Gen des GBS-Stammes 74-360 vollständig sequenziert und in späteren Arbeiten die Expression des CAMP-Faktors auf mRNA-Ebene überprüft (Podbielski et al. 1994). Die Sequenz des Strukturgens wies dabei gegenüber der *cbf*-Sequenz des Ausgangstammes R268 nur unbedeutende Veränderungen auf, so daß die beiden erstgenannten Möglichkeiten als Erklärung für die negative CAMP-Reaktion des Stammes 74-360 ausschieden. Dagegen fanden sich Punktmutationen und kleinere Insertionen und Deletionen im potentiellen Promotorbereich des *cbf*-Gens des Stammes 74-360, die unter anderem auch die -10 Box betrafen. Damit wich die Sequenz dieser -10 Box deutlich von der Konsensussequenz für bakterielle -10 Boxen ab. Prinzipiell gilt, daß je größer solche Sequenzabweichungen insbesondere der -10 Box sind, desto geringer aktiv ist ein solcher Promotor (Horwitz und Loeb, 1990).

Offenbar beeinträchtigen im Stamm 74-360 die Mutationen des *cbf*-Promotors dessen Funktion ausgiebig, da bei diesem Isolat zumindest durch Northern-Blot Hybridisierungen keine *cbf*-spezifische mRNA nachweisbar war (Podbielski et al. 1994). Daher ist zumindest in diesem Fall davon auszugehen, daß die negative CAMP-Reaktion auf die fehlende Expression eines an sich vorhandenen *cbf*-Gens zurückzuführen ist. Ob zur gestörten Promotorfunktion noch eine veränderte Expressions-Regulation durch einen Virulenz-Regulator kommt, oder letzterer Mechanismus sogar der ausschlaggebende ist, läßt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht entscheiden.

Das in GBS weit verbreitete Vorkommen des *cbf*-Gens spricht in Zusammenhang mit der Ko-zytolytischen Funktion des CAMP-Faktors für eine Funktion als Virulenzfaktor. Da aber auch der CAMP-Reaktions-negative Stamm 74-360 und die anderen untersuchten Stämme klinische Isolate von symptomatischen Patienten sind, scheint der CAMP-Faktor kein obligater Virulenzfaktor zu sein.

Durch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Nukleinsäuresequenz des *cbf*-Gens ist eine wichtige Grundlage zur weiteren Untersuchung der Rolle des CAMP-Faktors innerhalb des Infektionsgeschehen und damit der Pathogenese der GBS-Infektionen geschaffen worden. Weitere Untersuchungen mit rekombinanten Deletionsmutanten sollten Hinweise über die Lokalisation der kohämolytischen Aktivität im CAMP-Faktor und über das Vorliegen der von Jürgens et al. (1987) vermuteten Immunglobulin- oder Fc-Bindung sowie über die antigenen Eigenschaften der verschiedenen Bereiche des Proteins ermöglichen.

Damit sind die maßgeblichen Ziele dieser Arbeit, nämlich die Klonierung und Sequenzierung des den CAMP-Faktor kodierenden Gens, nach den anfänglichen Schwierigkeiten und frustrierten Bemühungen mit einem nicht das *cbf*-Gen enthaltenden Plasmid letztlich doch erfüllt worden.

5 Zusammenfassung

Das CAMP-Phänomen der Kohämolyse von Schafserythrozyten in Anwesenheit von β -Toxin aus *Staphylococcus aureus* ist eine seit langem bekannte Eigenschaft der Gruppe-B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*). Dieses Phänomen wird durch den "CAMP-Faktor" verursacht. Die Charakterisierung, Klonierung und Sequenzierung des für den CAMP-Faktor codierenden *cbf*-Gens aus *Streptococcus agalactiae* ist Bestandteil dieser Arbeit. Ausgehend von den von Schneewind et al. klonierten Plasmid pCO63 erfolgte zunächst eine Charakterisierung und Sequenzierung des 3,6 kB großen klonierten Fragments. Es zeigte sich, daß das klonierte Fragment eine CDP-Diglyzerid-Hydrolase aus *E. coli* beinhaltete, eine eindeutige kohämolytische Aktivität oder ein Ursprung aus chromosomaler Gruppe-B-Streptokokken-DNA konnte nicht nachgewiesen werden. Auf Basis der bekannten Aminosäuresequenz des CAMP-Faktors wurden degenerierte Primer entwickelt, mit deren Hilfe ein Fragment aus dem *cbf*-Gen kloniert werden konnte. Mit Hilfe der "inverted-PCR" wurden die fehlenden Fragmente amplifiziert, isoliert und kloniert; mit dieser Strategie konnte die gesamte *cbf*-Gensequenz ermittelt werden. Durch Klonierungsexperimente in temperatursensitiven Expressionssystemen konnte eine eindeutige Kohämolyse des Genprodukts nachgewiesen werden, die sich jedoch nur bei dem gesamten Protein zeigte. Die von uns untersuchten C- und N-terminalen Subfragmente zeigten keine kohämolytische Aktivität. Die Anwesenheit des *cbf*-Gens wurde in 19 klinischen Isolaten von *Streptococcus agalactiae* mittels Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen. Ein Sequenzvergleich mit dem CAMP-negativem Stamm 47-360 zeigte einige, möglicherweise relevante Mutationen im Promotorbereich.

6 Literaturverzeichnis

1. Anthony B.F., Eisenstadt R., Carter J. et al.: Genital and intestinal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J. infect. Dis.* 143 (1981): 761-66.
2. Baker C.J., Kasper D.L.: Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N. Engl. J. Med.* 294 (1976): 753 - 756.
3. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections: perinatal impact and prevention methods. *Ann N Y Acad Sci*; 549 (1988):193-202.
4. Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE.: Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun.* 70(6) (2002): 2869-76.
5. Bernheimer A.W., Lindner R., Avigad L.S.: Nature and mechanism of action of the CAMP-protein of group B streptococci. *Infect. Immun.* 23 (1979): 838-844.
6. Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F.: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Mar;23(3):168-73. Epub 2004 Feb 25.
7. Bohnsack J.F., Chang J.K., Hill H.R.: Restricted ability of group B streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species. *Infect. Immun.* 61 (1993): 1421-1426.
8. Bolanos M, Canas A, Santana OE, Perez-Arellano JL, de Miguel I, Martin-Sanchez AM.: Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001 Nov;20(11):837-9.
9. Bolton E.T., Mc Carthy B.J.: A general method for the isolation of RNA complementary to DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48 (1962): 1390.
10. Boyer K.M., Gadzala C.A., Burd L.I. et al.: Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. 1. Epidemiologic rationale.: *Infect. Dis.* 148 (1983): 795-801.
11. Boyle M. D. P., Hawlitzky J., Raeder R., Podbielski A.: Analysis of genes encoding two unique Type IIa Immunglobulin G-binding proteins expressed by a single group A streptococcal isolate.: *Infect. Immun.* 62 (1994): 1336 - 1347.
12. Briesacher M.R., Daly J.A., Carroll K.C., Hill H.R., Bohnsack J.F.: Frequency of expression of C5a-ase in human isolates of group B streptococcus. *Pediatr. Res.* 37 (1995): 288A
13. Brown J., Farnsworth R., Wannamaker L.W. Johnson D.W.: CAMP-Factor of group B streptococci: Production assay and neutralization by sera of immunized rabbits and experimental infected cows.: *Infect. Immun.* 9 (1974): 371-383.
14. Cheng Q, Stafslien D, Purushothaman SS, Cleary P.: The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun.* 70(5) (2002): 2408-13.
15. Christie R., Atkins R.N.E., Munch-Petersen E.: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22 (1944):197-200.
16. Cleary P.P., Handley J., Suvurov A.N., Podbielski A., Ferrieri P.: Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes. *Infect. Immun.* 60 (1992): 4239-4244.

17. Cochi SL, Feldman RA.: Estimating national incidence of group B streptococcal disease: the effect of adjusting for birth weight. *Pediatr. Infect. Dis.* 2 (1983): 414-5.
18. Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics* 90 (1992): 775-8.
19. Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Guidelines for Prevention of Group B Streptococcal Infection by Chemoprophylaxis. *Pediatrics* 90, (1992): 775-778.
20. Conrads G., Podbielski A., Lütticken R.: Klonierung und Sequenzierung des Hämolyins aus Gruppe B Streptokokken. *Zentralbl. Bakt.* 275 (1991):179-194.
21. Dahl MS, Tessin I, Trollfors B.: Invasive group B streptococcal infections in Sweden: incidence, predisposing factors and prognosis. *Int J Infect Dis.* 7 (2003): 113-9.
22. D'Aubenton Carafa Y., Brody E., Thormers C.: Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. *J. Mol. Biol.* 216 (1990): 835-858.
23. Edwards M.E., Kasper D.L., Jennings H.J., Baker C.J., Nicholson-Weller A.: Capsular sialic acid prevents activation of the alternative pathway by type III group B streptococci. *J. Immunol.* 128 (1982): 1278-1283.
24. Edwards M.S., Wessels M.R., Baker C.J.: Capsular polysaccharide regulates neutrophil complement receptor interactions with type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 61 (1990): 2866-2871.
25. Ehrlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252 (1991): 1643-1651.
26. Farley MM.: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis.* 33 (2001):556-61.
27. Ferrieri P.: GBS enzymes, hemolysin, toxins and other products. *Antibiot. Chemother.* 35 (1985): 57 – 70.
28. Fraser G.: Hemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. *Nature* 189 (1961): 246.
29. Fraser G.: The hemolysis of animal erythrocytes by *Pasteurella haemolytica* produced in conjunction with certain staphylococcal toxins. *Res. Vet. Sci.* 3 (1962): 104-110.
30. Frey J., Perrin J., Nicolet J.: Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP-factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57 (1989): 2050-2056.
31. Fry R.M., Eng M.R.C.S.: Fatal infections by hemolytic Streptococcus group B. *Lancet* 1 (1938): 199.
32. Girgis S.I., Alevizaki M., Denny P. et al.: Generation of DNA probes with highly degenerate codons using mixed primer PCR: *Nucl. Acids Res.* 21 (1988): 10371.
33. Glaser P., Rusniok C., Buchrieser C., et al.: Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol. Microbiol.* 45 (2002): 1499-1513.
34. Gordon J.S., Sbarra A.J.: Incidence, technique of isolation, and treatment of group B streptococci.: *Am. J. Obstet. Gynecol.* 126 (1976): 1023-26.
35. Granato P.A., Jackson R.W.: Bicomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J. Bacteriol.* 100 (1969): 865-868.

36. Grunstein M., Hogness D.S.: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1975): 3961-3965.
37. Gutekunst H., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.: The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun.* 72(6) (2004): 3495-504.
38. Haanes-Fritz E., Kraus W., Burdett V., Dale J.B., Beachey E., Cleary P.: Comparison of the leader sequences of four group A streptococcal M protein genes. *Nucl. Acids Res.* 16 (1988): 4667-4677.
39. Hall R.T., Kurth C.G.: Value of negative nose and ear cultures in identifying high-risk infants without early-onset group B streptococcal sepsis. *J. Perinatol.* 15 (1995): 356-358.
40. Hanahan D., Meselson M.: Plasmid screening at high colony density. *Meth. Enzymol.* 100 (1983): 333-342.
41. Hanahan D.: Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J.Mol.Biol.* 166 (1983), 557-580.
42. Harley C.B., Reynolds R.P.: Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* 15 (5) (1987): 2343 - 2361
43. Hawley D.K., McClure W.R.: Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 11, (1983): 2237-2255,.
44. Heden L.O., Frithz E., Lindahl G.: Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: Sequence of the gene, identification of proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity. *Eur. J. Immunol.* 21 (1991): 1481-1490.
45. Heeschen W., Tolle A., Zeidler H.: Zur Klassifizierung der Gattung *Streptococcus*. *Zentralbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. [A]* 205 (1967): 250-259.
46. Hickman M.E., Rench M.A., Ferrieri P., Baker C.J.: Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104 (1999): 203-209.
47. Hordes K., Tynning T., Kvam A.L., Jonsson R., Haneberg B.: Colonization in the rectum and uterine cervix with group B streptococci may induce specific antibody responses in cervical secretions of pregnant women. *Infect. Immun.* 64 (1996): 1643-1652.
48. Horwitz M.S., Loeb L.A.: Structure-function relationships in *Escherichia coli* promoter DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 38 (1990):137-164.
49. Huang T.T., Mahlke H., Ferretti J.J.: Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. *Infect. Immun.* 57 (1989), 502-506
50. Hulse M.L., Smith S., Chi E.Y., Pham A., Rubens C.R.: Effect of type III group B streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 61 (1993): 4835-4841.
51. Huser H., Goeke L., Karst G., Fehrenbach F.J.: Fermenter growth of *Streptococcus agalactiae* and large-scale production of CAMP-Factor. *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983):1295-1300.
52. Icho T., Bulawa E.B., Raetz R.H.: Molecular cloning of the gene for CDP-diglyceride Hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260 (1985): 12092-12098.
53. Jürgens B., Sterzik B., Fehrenbach F.J.: Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP-factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J. Exp. Med.* 165 (1987): 720-732.

54. Jürgens D., Shalaby F.Y.Y.I., Fehrenbach F.J.: Purification and characterization of CAMP-Factor from *Streptococcus agalactiae* by hydrophobic interaction chromatography and chromatofocusing. *J. Chromatogr.* 348 (1985): 363-370.
55. King P.V., Blakesly R.W.: Optimizing DNA Ligations for Transformation. *Focus* 8:1 (1986), 1-3.
56. Lancefield R.C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Immunol.* 89 (1933): 571-595.
57. Loh E.Y., Elliot J.F., Cwirla S. et al.: Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T-cell receptor δ -chain. *Science* 243 (1989): 217-220.
58. Lütticken R., Schneewind O., Schmidt A., Mühlenbrock E.: Cloning of the genetic determinant of the group B streptococcal hemolysin in *E. coli*. *Bacterial Protein Toxins, Zbl. Bakt. Suppl.* 17 (1988): 237-238.
59. Lütticken R., Sternschulte W., Günther H., Eibach H.W., Bolte A.: Neugeborenen-Sepsis und -Meningitis durch Gruppe-B-Streptokokken. *Dtsch. Ärztebl.* 80 (1983): 32-40.
60. Mandell G.L., Douglas R.G. Jr., Bennet J.E. (Eds.): Principles and practice of infectious diseases; 3rd. Edition (1990); Churchill Livingstone Inc., New York.
61. Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K., Wessels M.R.: Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 60 (1992): 3986-3993.
62. Matthews J.A., Kricka L.J.: Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal. Biochem.* 169 (1988): 1-25.
63. Matthews J.A., Kricka L.J.: Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal. Biochem.* 169 (1988): 1-25.
64. Mc Donald H., Vigneswaran R., O'Loughlin J.A.: Group B streptococcal colonization and preterm labour. *Aust. N Z J Obstet. Gynecol.* 29 (1989): 291-293.
65. Meinkoth J., Wahl G.: Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138 (1984): 267-284.
66. Michel J.L., Madoff L.C., Olson K. et al.: Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen, *bca*, of group B streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992): 10060-10064.
67. Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold spring harbor symp. Quant. Biol.* 51 (1986): 263.
68. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 (1987): 335.
69. Nizet V.: Streptococcal β -hemolysins: genetic and role in disease pathogenesis. *TRENDS Microbiol.* 10 (2002): 575-580.
70. Nizet V.: Response from Nizet: Cyll and group B streptococcal hemolysis. *TRENDS Microbiol.* 11 (2003): 498
71. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L.: Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120 (1988): 621-623.
72. Pincus S.H., Cole R.L., Kamanga-Solla E., Fischer S.H.: Interaction of group B streptococcal opacity variants with the host defense system. *Infect. Immun.* 61 (1993): 3761-3768.

73. Podbielski A., Blankenstein O., Lütticken R.: Molecular characterization of the *cbf*-gene encoding the group B streptococcal CAMP-factor. *Med. Microbiol. Immunol.* 183 (1994): 239-256.
74. Pritchard D.G., Lin B.: Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect. Immun.* 61 (1993): 3234-3239.
75. Pritzlaff C.A., Chang J.C., Kuo S.P., Tamura G.S., Rbens C.E., Nizet V.: Genetic basis for the beta-hemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus. *Mol. Microbiol.* 39 (2001): 236-247.
76. Ratner H.B., Weeks L.S., Stratton C.W.: Evaluation of spot CAMP-test for identification of group B streptococci. *Clin. Microbiol.* 24 (1986): 296-297.
77. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P., Eschenbach D.A., Blackwelder W.C., Lou Y., Gibbs R.S., Rettig P.J., Martin D.H., Edelmann R.: Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174 (1996): 1354- 1360.
78. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P., Vaginal Infections and Prematurity study group: The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 77 (1991): 604-610.
79. Rubens C.E., Wessels M.R., Heggen L.M., Kasper D.L.: Transposon mutagenesis of group B streptococcal type III capsular polysaccharide: correlation of capsule expression with virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987): 7208 - 7212.
80. Rühlmann J., Jürgens D., Fehrenbach F.J.: Separation of large hydrophobic fragments of Protein B (CAMP-Factor). *Zentralbl. Bakt. Hyg. [Suppl.]* 17 (1988):63-64.
81. Rühlmann J., Kruft V., Wittmann-Liebold B., Fehrenbach F.J.: sequence similarity between protein B and human apolipoprotein A-IV. *FEBS Lett.* 249 (1989): 151-154.
82. Rühlmann J., Wittmann-Liebold D., Jürgens D., Fehrenbach F.J.: Complete amino acid sequence of protein B. *FEBS letters* 235 (1988): 262-266.
83. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988b): 487.
84. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Ehrlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (1985): 1350.
85. Sambrook J., Fritsch, Maniatis: Molecular cloning; A laboratory manual; 2. Aufl., 1989; Cold Spring Harbour laboratory Press
86. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1977): 5463.
87. Schauder B., Blöcker H., Frank R., McCarthy J.E.G.: Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* translation initiation region. *Gene* 52 (1987): 279 - 283.
88. Schlievert P.M., Gocke J.E., Deringer J.R.: Group B streptococcal toxic shock-like syndrome: Report of a case and purification of an associated pyogenic toxin. *Clin. Infect. Dis.* 17 (1993): 26 – 31.
89. Schneewind O.: Klonierung der genetischen Determinante des CAMP-Faktors der Gruppe B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*). Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Köln (1988).
90. Schneewind O., Friedrich K., Lütticken R.: Cloning and Expression of the CAMP-Factor of Group B Streptococci in *Escherichia Coli*. *Inf. Immun.* 56(8) (1988): 2174 – 2179.

91. Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.: A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol.* 46(2)(2002): 557-69.
92. Seeburg P.H., Shine J., Montial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M.: Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone; *Nature* 270 (1977):486.
93. Spellerberg B., Pohl B., Haase G. et al.: Identification of Genetic Determinants for the Hemolytic Activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 Transition. *J. Bacteriol.* 181(10) (1999): 3212 – 3219.
94. Spellerberg B.: Cyll and group B streptococcal hemolysis *TRENDS Microbiol.* 11 (11) (2003): 497-498.
95. Spratt B.G., Hedge P.J., te Heesen S., Edelmann A., Browne-Smith J.K.: Kanamycin resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9.: *Gene* 41 (1986):337-342.
96. Stalhammar-Carlemalm M., Stenberg L. , Lindahl G.: Protein Rib: A novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J. Exp. Med.* 177 (1993): 1593-1603.
97. Sterzig B., Schmidt C.M., Fehrenbach F.J.: Interaction of the CAMP-factor from *S. agalactiae* with artificial membranes. In: Alouf J.E., Fehrenbach F.J., Jeljaszewicz J. (Hrsg.): *Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, London (1984): 195-196.
98. Stevens KR, Van M, Lamphear JG, Orkiszewski RS, Ballard KD, Cook RG, Rich RR: Species-dependent post-translational modification and position 2 allelism: effects on streptococcal superantigen SSA structure and V beta specificity. *J. Immunol.* 157(6) (1996): 2479-2487.
99. Tabor S., Richardson C.C.: DMA sequence analysis with a modified bacteriophage T7-DNA-polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987): 4767-4771.
100. Takahashi S., Aoyagi Y., Adderson E.E., Okuwaki Y., Bohnsack J.F.: Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. *Inf. Immun.* 67 (1999): 1866-1870.
101. Takaisi Kikuni N.B., Fehrenbach F.J.: Production and cellular compartmentation of Protein B (CAMP-Factor) from group B streptococci. *Bacterial Protein Toxins, Zbl. Bakt. Suppl.* 17 (1988): 165-166
102. Tamura GS, Nittayajarn A, Schoentag DL.: A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect Immun.* 70(6) (2002): 2877-85.
103. Tapsall J.W., Phillips E.A.: The hemolytic and cytolytic activity of group B streptococcal hemolysin and its possible role in early onset group B streptococcal disease. *Pathology* 23(2) (1991): 139 – 144.
104. Thomsen A.C., Morup C.L., Hansen K.B.: Antibiotic elimination of group B streptococci in urine in prevention of preterm labour.: *Lancet* 1 (1987): 591-593.
105. Triglia T., Peterson M.G., Kemp D.J.: A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl. Acids Res.* 16 (1988): 8186.
106. Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alagaratnam M, Lovgren M, Talbot JA.: Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a

- Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators.; J Infect Dis. 182 (2000):168-73.
107. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W.J. Goodman H.M.: Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. Science 196 (1977):1313.
108. Vieira J., Messing J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19 (1982): 259-268.
109. von Heijne G: The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. Protein Eng 2(7), (1989): 531-534.
110. Weisner J.N., Rubens C.E.: Transposon mutagenesis of group B streptococcus beta-hemolysin biosynthesis. Infect. Immun. 55 (1987): 2314 – 2316.
111. Wessels M.R., Pozsgay V., Kaspar D.L., Jennings H.J.: Structure and immunochemistry of of an oligosaccharid repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B streptococcus. J. Biol. Chem. 262 (1987): 8262 - 8267.
112. Wessels M.R., Rubens C.E., Benedi V.J., Kasper D.L.: Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989): 8983 - 8987.
113. Wibawan I.W.T., Lämmle C.: Properties of group B streptococci with surface antigen X and R. J. Clin. Microbiol. 28 (1990): 2834-2836.
114. Wilkinson H.W.: CAMP-Disk test for presumptive identification of group B streptococci. Clin. Microbiol. 6 (1977): 42-45.
115. Winnacker E.L.: From genes to clones. VCH Publishers, Weinheim/NewYork, 1987.
116. Wirth R.: Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. Forum Mikrobiologie 11/89: 507-517.
117. Zhou C., Yang Y., Jong A.Y.: Mini-Prep in ten minutes. BioTechniques 8 (1990): 172-173.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofesor Dr. med. R. Lütticken, der durch die Auswahl und die Bereitsellung des Themas diese Dissertation ermöglichte und deren Betreuung sichergestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. Andreas Podbielski für unermüdliche, aktive technische und inhaltliche Unterstützung nicht nur in der Phase der praktischen Arbeiten, sondern auch in den folgenden Jahren. Seine hervorragende und engagierte Betreuung war eine große Hilfe in den verschiedenen Phasen der Umsetzung und Fertigstellung.

Mein Dank für Anleitung und Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und technischen Fragen gilt Frau Beate Melzer-Krick, Frau Jutta Schönling und Frau Fine Weber-Heynemann.

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich für Freiräume und anhaltende Unterstützung meiner Ideen und Projekte - auch dort, wo ich nicht den geraden Weg gewählt habe.

Frau Ulla Fleckhaus danke ich für einen schönen Ort zum Schreiben dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern für praktische und moralische Unterstützung, für nötige und unnötige Sorgen und insbesondere für ihre Bemühungen um die Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne sie wäre sowieso vieles nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Oliver Blankenstein

Anschrift: Söllerpfad 6
1365 Berlin
Tel: 030-40108865

Geburtsdatum: 16.07.1965

Geburtsort: München

Eltern: Marianne Blankenstein, geb. Martini, Chemikerin
Dr. rer. Nat. Günter Blankenstein, Chemiker

Familienstand: Verheiratet mit Monika Blankenstein, Ärztin,
drei Kinder

Ausbildung:

1984 Abitur, Geschwister Scholl Gymnasium Pulheim

1984-1992 RWTH Aachen, Studium der Humanmedizin

Mai 1992 Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang:

Okt. 1992 bis Feb. 1993 Arzt im Praktikum, Institut für Pathologie, der RWTH Aachen
(Direktor: Prof. Dr. Ch. Mittermayer)

Feb. 1993 bis März 1994 Arzt im Praktikum, Kinderklinik der RWTH Aachen, Lehr- und
Forschungsgebiet Neonatologische Intensivmedizin (Leiter: Prof.
Dr. H. Hörnchen)

1994 bis 1999 Assistenzarzt an der Kinderklinik der RWTH Aachen,

1999 Anerkennung als Facharzt für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin

1999 bis 2001- Assistenzarzt, Kinderklinik der RWTH Aachen, Lehr- und
Forschungsgebiet Neonatologische Intensivmedizin

2001 - 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Experimentelle
Pädiatrische Endokrinologie, CVK, Charité Universitätsmedizin
Berlin (Direktorin: Frau Prof. Dr. med. A. Grüters)
Tätigkeit im Sozialpädiatrischen Zentrum für chronisch Kranke
Kinder

Leitung des Neugeborenen-Screeninglabor

seit April 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinische Klinik m. S.
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie,
Charité-Universitätsmedizin Berlin, CCM
Bereich Endokrinologie (Leitung Prof. Dr. med. C. Strasburger)