

**Molekulare und biochemische Charakterisierung
des Wirk- und Resistenzmechanismus von
TAN1057 in *Staphylococcus aureus***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Endrik Limburg
aus Köln

Köln, 2004

Berichtersteller:

Privatdozent Dr. Reinhold Gahlmann

Professor Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Februar 2004

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmaforschungszentrum Wuppertal der Bayer AG im Institut für Antiinfektiva-Forschung durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Reinhold Gahlmann für die interessante Aufgabenstellung und die Betreuung der Promotion.

Herrn Dr. Dieter Beyer und Herrn Dr. Hein-Peter Kroll danke ich für deren Unterstützung und die unermüdliche Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion.

Ich danke der Institutsleitung der Antiinfektiva-Forschung des Pharmaforschungszentrums Wuppertal der Bayer AG, Frau Prof. Helga Rübsamen-Waigmann und Herrn Prof. Harald Labischinski für die Ermöglichung und Unterstützung dieses Forschungsprojekts.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für deren außerordentliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre.

Der größte Dank gebührt allerdings meinen Eltern - aus mehr Gründen, als ich je aufzählen könnte.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ANTIBIOTIKA: URSPRÜNGE, DEFINITION UND KLASSIFIZIERUNG	1
1.1.1	Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese	3
1.1.2	Membranwirksame Antibiotika	4
1.1.3	Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerasen	4
1.1.4	Inhibitoren der Folsäuresynthese.....	4
1.1.5	Der Transkriptioneninhibitor Rifampicin	5
1.1.6	Inhibitoren der bakteriellen Translation	5
1.1.6.1	<i>Aufbau des bakteriellen Ribosoms</i>	5
1.1.6.2	<i>Die Struktur der ribosomalen RNA</i>	6
1.1.6.3	<i>Posttranskriptionelle Modifikationen der ribosomalen RNA</i>	9
1.1.6.4	<i>Posttranslationale Modifikationen der ribosomalen Proteine</i>	12
1.1.6.5	<i>Die bakterielle Translation</i>	12
1.1.6.5.1	Die Initiation der bakteriellen Translation.....	12
1.1.6.5.2	Die Elongation der bakteriellen Translation	13
1.1.6.5.3	Die Termination der bakteriellen Translation	14
1.1.6.6	<i>Inhibitoren der bakteriellen Translation</i>	14
1.1.6.7	<i>Inhibitoren der ribosomalen 30S-Untereinheit</i>	14
1.1.6.8	<i>Inhibitoren der ribosomalen 50S-Untereinheit</i>	15
1.2	ANTIBIOTIKARESISTENTE PATHOGENE UND DIE NOTWENDIGKEIT NEUER ANTIBIOTIKA.	16
1.2.1	Die genetische Grundlage der Antibiotika-Resistenz	17
1.2.2	Die bakteriellen Systeme der Antibiotika-Resistenz.....	18
1.2.2.1	<i>Verringerte Substanzaufnahme</i>	18
1.2.2.2	<i>Aktiver Substanzexport</i>	18
1.2.2.3	<i>Inaktivierung antibakterieller Substanzen</i>	19
1.2.2.4	<i>Modifikation des antibakteriellen Wirkortes</i>	20
1.3	DAS DIPEPTID-ANTIBIOTIKUM TAN1057	20
1.3.1	Chemische Struktur, Eigenschaften und Synthese von TAN1057	21
1.3.2	Wirkpektrum und minimale Hemmkonzentration (MHK) von TAN1057.....	23
1.3.3	Der Wirkmechanismus von TAN1057	24
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24

2	MATERIAL	26
2.1	GERÄTE.....	26
2.1.1	Bestimmung von DNA/Proteinkonzentrationen	26
2.1.2	Dichtebestimmung von Bakteriensuspensionen	26
2.1.3	Keimzahlbestimmung in Bakteriensuspensionen.....	26
2.1.4	PCR	26
2.1.5	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	26
2.1.6	Scintillationszähler	26
2.1.7	Thermomixer.....	26
2.1.8	UV-Visualisierungssysteme	26
2.1.9	Vakuumsysteme	27
2.1.10	Visualisierung von DNA in Agarosegelen	27
2.1.11	Visualisierung von Proteinen in SDS/PAGE-Gelen.....	27
2.1.12	Zellaufschluß.....	27
2.1.13	Zentrifugen und Rotoren	27
2.1.14	Autoradiographie.....	28
2.1.15	Gerätezubehör	28
2.2	LABORMATERIAL.....	28
2.2.1	Verbrauchsgüter	28
2.2.2	Kits.....	29
2.2.3	Enzyme und Puffer	29
2.2.4	Größenmarker und Standards	29
2.2.5	Chemikalien	29
2.2.6	Radiochemikalien.....	31
2.2.7	Nährmedien	31
2.2.8	Puffer und Lösungen.....	31
2.2.8.1	<i>Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	<i>31</i>
2.2.8.2	<i>Puffer und Lösungen für die SDS/PAGE Gelelektrophorese</i>	<i>32</i>
2.2.8.3	<i>Puffer zum enzymatischen Zellaufschluß gram-positiver Organismen</i>	<i>33</i>
2.2.8.4	<i>Puffer zur Herstellung von S30-Extrakten aus S. aureus.....</i>	<i>33</i>
2.2.8.5	<i>Qiagen Puffer.....</i>	<i>34</i>
2.2.9	Antibiotika	36
2.2.10	Bakterienstämme	37
2.2.11	Plasmide	37

2.2.12	PCR-Primer.....	37
3	METHODEN	38
3.1	ARBEITEN MIT BAKTERIEN	38
3.1.1	Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur	38
3.1.2	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten.....	38
3.1.3	Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen	38
3.1.4	Keimzahlbestimmung von Bakterienkulturen	38
3.1.5	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von antibakteriell wirksamen Substanzen.....	39
3.1.6	Selektion antibiotikaresistenter Bakterienstämme.....	39
3.1.7	Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterienstämmen	40
3.2	ARBEITEN MIT DNA	40
3.2.1	Bestimmung der Konzentration von DNA in Lösungen	40
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Restriktionskartierung genomischer DNA aus <i>S. aureus</i>	41
3.2.4	Anfärben von DNA-Banden in Agarosegelen.....	42
3.2.5	DNA-Präparation genomischer DNA durch enzymatischen Zellaufschluß... 43	
3.2.6	Isolierung des Plasmids pKV48 aus <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	43
3.2.7	Gen-Amplifikation mittels der PCR-Methode	44
3.2.8	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	44
3.2.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	44
3.3	PCR-PRIMERDESIGN.....	45
3.3.1	PCR-Amplifikation der 23S-rRNA Operons aus <i>S. aureus</i>	45
3.3.2	Sequenzierung der 23S-rRNA Operons aus <i>S. aureus</i>	46
3.3.3	PCR-Amplifikation der Pseudouridinsynthase-Operons aus <i>S. aureus</i>	46
3.3.5	PCR-Amplifikation der L-Protein Operons aus <i>S. aureus</i>	48
3.3.7	PCR-Amplifikation und Sequenzierung des rplB-Operons aus <i>E. coli</i>	50
3.4	DNA-SEQUENZIERUNG UND DATENANALYSE	51
3.5	PHYLOGENETISCHER VERGLEICH VON PROTEINSEQUENZEN	52
3.6	ARBEITEN MIT PROTEINEN UND RIBOSOMEN	54
3.6.1	Herstellung von S30-Extrakten	54
3.6.2	Herstellung von 70S-Ribosomen und S150-Fractionen	55

3.6.3	Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion	55
3.6.3.1	<i>Visualisierung von ³⁵S-markierten Proteinen mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese</i>	57
3.6.3.2	<i>Quantifizierung von ³⁵S-Methionin in Proteinen</i>	58
3.6.4	IC ₅₀ -Berechnung für TAN1057 und Erythromycin in der gekoppelten <i>in vitro</i> Transkriptions-/Translationsreaktion	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	SELEKTION TAN1057-RESISTENTER <i>S. AUREUS</i> 133 STÄMME	60
4.2	KONTROLLE DER ENTWICKLUNG TAN1057-RESISTENTER <i>S. AUREUS</i> STÄMME	62
4.3	WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT TAN1057-RESISTENTER <i>S. AUREUS</i> STÄMME.....	65
4.4	KREUZRESISTENZEN DER TAN1057-RESISTENTEN <i>S. AUREUS</i> STÄMME GEGEN 19 KONTROLLSUBSTANZEN	66
4.5	PULSFELD-GELELEKTROPHORESE GENOMISCHER DNA AUS <i>S. AUREUS</i>	69
4.6	GEKOPPELTE IN VITRO TRANSKRIPTION-/TRANSLATION ZUR IC ₅₀ BESTIMMUNG VON TAN1057 IN S30-ZELLEXTRAKTEN AUS <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	70
4.6.1	Gelelektrophoretische Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes von Erythromycin	72
4.6.2	Gelelektrophoretische Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes von TAN1057	73
4.6.3	TCA-Fällung und Quantifizierung ³⁵ S-markierter Proteine	73
4.6.5	Gekoppelte Transkriptions-/Translations Experimente mit 70S- und S150-Fraktionen aus <i>S. aureus</i> SA133TA0 und SA133TA6a	79
4.7	PCR-AMPLIFIKATION UND SEQUENZIERUNG DER 23S-RRNA OPERONS AUS <i>S. AUREUS</i>	80
4.8	PCR-AMPLIFIKATION UND SEQUENZIERUNG DER PSEUDOURIDINSYNTHESE-GENE IN <i>S. AUREUS</i>	89
4.8.1	Primer-Design und PCR-Amplifikation	90
4.8.2	Sequenzanalyse der Pseudouridinsynthasen	90
4.8.2.1	<i>Phylogenetische Untersuchung der Pseudouridinsynthase TruA</i>	93
4.9	PCR-AMPLIFIKATION UND SEQUENZIERUNG DER OPERONS ALLER RIBOSOMALEN L-PROTEINE IN <i>S. AUREUS</i>	94
4.9.1	Primer-Design und PCR-Amplifikation	95
4.9.2	Sequenzanalyse der ribosomalen L-Proteine	96
4.9.2.1	<i>Das ribosomale Protein L9</i>	97
4.9.2.2	<i>Das ribosomale Protein L19</i>	97

4.9.2.3	<i>Das ribosomale Protein L27</i>	97
4.9.2.4	<i>Das ribosomale Protein L3</i>	98
4.9.2.4.1	Phylogenetische Untersuchung des ribosomalen Proteins L3	102
4.9.2.5	<i>Das ribosomale Protein L2</i>	103
4.9.2.5.1	Phylogenetische Untersuchung des ribosomalen Proteins L2	110
5	DISKUSSION	113
5.1	TAN1057-RESISTENZENTWICKLUNG IN <i>S. AUREUS</i>	114
5.2	PULSFELD-GELELEKTROPHORESE DER GENOMISCHEN DNA AUS <i>S. AUREUS</i>	115
5.3	WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT TAN1057-RESISTENTER <i>S. AUREUS</i> STÄMME....	116
5.4	KREUZRESISTENZEN DER TAN1057-RESISTENTEN <i>S. AUREUS</i> STÄMME GEGEN 19 KONTROLLSUBSTANZEN	117
5.5	DIE GEKOPPELTE TRANSKRIPTION/TRANSLATION IN S30-EXTRAKTEN AUS <i>S. AUREUS</i> SA133TA0 BIS SA133TA6A	119
5.6	VERGLEICH DER WÄHREND DER TAN1057-RESISTENZENTWICKLUNG SELEKTIONIERTEN <i>S. AUREUS</i> STÄMME SA133TA0 BIS SA133TA6A.....	121
5.7	MÖGLICHE URSACHEN DER TAN1057-RESISTENZ.....	122
5.7.1	Mutationen der ribosomalen RNA als Ursache der TAN1057-Resistenz ...	122
5.7.2	Modifikationen der ribosomalen RNA als Ursache der TAN1057-Resistenz	126
5.7.3	Mutationen der ribosomalen L-Proteine als Ursache der TAN1057-Resistenz	128
5.7.3.1	<i>Das ribosomale Protein L3</i>	129
5.7.3.2	<i>Das ribosomale Protein L2</i>	130
5.7.3.3	<i>Varianz der Aminosäuresequenz ribosomaler L-Proteine in S. aureus</i>	138
6	ZUSAMMENFASSENDER BETRACHTUNG DER TAN1057- RESISTENZ- VERMITTELNDEN FAKTOREN IN <i>S. AUREUS</i>	139
7	LITERATURVERZEICHNIS	145
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	163
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	167

10	TABELLENVERZEICHNIS	170
11	KURZZUSAMMENFASSUNG	172
12	ABSTRACT.....	173
	ERKLÄRUNG	174
	LEBENS LAUF.....	175

1 Einleitung

1.1 Antibiotika: Ursprünge, Definition und Klassifizierung

Die moderne Chemotherapieforschung wurde von Paul Ehrlich mit der systematischen Suche nach Substanzen zur Therapie von Trypanosomiasis und Syphilis begründet. Er entdeckte bei dieser Forschung das p-Rosanilin mit anti-trypanosomaler Wirkung und Arsphenamin, eine Substanz mit effektiver Wirkung gegen Syphilis. Paul Ehrlich postulierte die Möglichkeit, Chemikalien mit selektiver Toxizität gegen Parasiten zu finden. Die Suche nach solchen Substanzen erwies sich jedoch als wenig erfolgreich, bis Gerhard Domagk um 1932 den antibakteriellen Effekt von Prontosil – dem Vorläufer der Sulfonamide – entdeckte. Die Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming erfolgte zwar bereits im Jahr 1928, die Tragweite dieser Entdeckung wurde jedoch erst später erkannt.

1944 erfolgte die Isolation von Streptomycin durch Waksman, gefolgt von der Entdeckung weiterer antibakteriell wirksamer Naturstoffe aus Bodenproben wie z. B. Chloramphenicol, Tetrazyklin und Erythromycin. Ab 1960 erlaubten Fortschritte in der Fermentationstechnik und der medizinischen Chemie die Synthese vieler weiterer chemotherapeutischer Substanzen durch die molekulare Modifikation existierender Substanzen zur Optimierung der Wirkung oder Anpassung an neue Bedürfnisse [10].

Der Aufbau der Zielzellen bestimmt die Zugänglichkeit zum Wirkort antibakterieller Substanzen:

- Antibiotika aus der Gruppe der Polymyxine wirken auf die gut zugängliche bakterielle Zellmembran. Für die meisten anderen Antibiotika stellen Zellwand und Zellmembran jedoch ein Hindernis dar, welches auf dem Weg zum Wirkort überwunden werden muss [105, 106].
- Im Falle gram-positiver Bakterien wie Streptokokken und Staphylokokken befindet sich außerhalb der cytoplasmatischen Membran nur kapsuläres Material und eine Peptidoglykan-Schicht [10, 104]. Für antibakterielle Substanzen mit Wirkort in den äußeren Schichten der cytoplasmatischen Membran (Vancomycin, β -Lactame) besteht daher in diesen Fällen ebenfalls ein relativ ungehinderter Zugang zum Wirkort [106].

- Gram-negative Organismen besitzen jedoch darüber hinaus noch eine äußere Zellmembran, welche die Peptidoglykan-Schicht umschließt. Die äußere Zellmembran besitzt Poren, die Substanzen den Zugang durch passive Diffusion ermöglichen. Die Passage von Substanzen durch diese Membranporen ist abhängig von Größe, Ladung und Hydrophilie der Substanzen, sowie von der Anzahl der Membranporen. Substanzen mit einer Masse > 800 Da sind nicht in der Lage, diese Poren zu durchdringen [105].
- Antibiotika, welche die bakterielle Replikation, Transkription, Translation oder enzymatische Stoffwechselfvorgänge beeinflussen, müssen die cytoplasmatische Membran jedoch durchdringen – durch Diffusion oder durch einen aktiven Transportmechanismus [104, 106, 107].

Abbildung 1 verdeutlicht die Wirkorte der wichtigsten Antibiotika-Klassen:

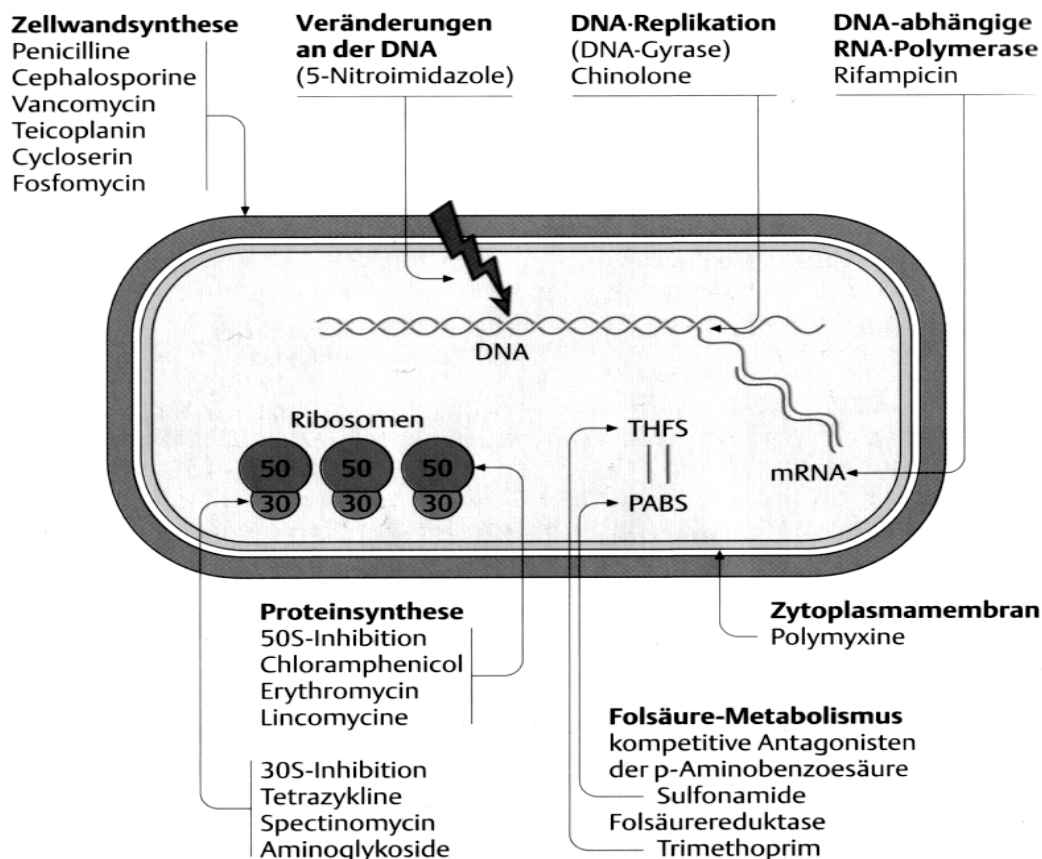


Abbildung 1: Die Wirkorte der wichtigsten Antibiotika-Gruppen an und in der bakteriellen Zelle. Quelle: modifiziert nach [69]

Tabelle 1 fasst die wichtigsten Substanzklassen und ihre Wirkorte zusammen:

Wirkort	Substanzklassen
Zellmembran & Zellwand	β -Lactame, Glykopeptide, Polymyxine
DNA / Topoisomerasen	Chinolone
Folsäuresynthese	Sulfonamide, Trimethoprim
Transkription	Rifampicin
Translation	Aminoglykoside, Tetrazykline, Makrolide, Lincosamide, Streptogramine, Chloramphenicol, Ketolide, Oxazolidinone

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten Antibiotika-Klassen und ihrer Wirkorte.

Aufgrund ihrer pharmakodynamischen Charakteristika werden antimikrobiell wirksame Substanzen in drei Hauptgruppen unterteilt [101, 125]:

- Substanzen mit einer konzentrationsabhängig bakteriziden Wirkung über einen weiten Konzentrationsbereich (z.B. Aminoglykoside, Fluorochinolone).
- Substanzen mit einer zeitabhängig bakteriziden Wirkung ohne Abhängigkeit zur Substanzkonzentration solange diese über einem minimal effektivem Schwellenwert liegt (z.B. Vancomycin, β -Lactame).
- Substanzen mit vorwiegend bakteriostatischer Wirkung.

1.1.1 Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese

Die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika unterteilt sich in die Substanzklassen der Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame. Sowohl die Antibiotika-Klasse der β -Lactame als auch die der Glykopeptide wirken inhibierend auf die bakterielle Zellwandsynthese [88, 105, 106, 119]. Die Wirkung der β -Lactame beruht auf ihrer kovalenten Bindung an die bakteriellen Transpeptidasen. Durch die Inaktivierung der Transpeptidase-Aktivität wird die Peptidoglykanreifung verhindert, so dass die Reifung der bakteriellen Zellwand nicht abgeschlossen werden kann [119, 169, 175]. Vancomycin verhindert ebenfalls die Peptidoglykanreifung. Das Glykopeptid bindet an die zwei terminalen D-Alanine der Peptidseitenketten. Dadurch verhindert Vancomycin die zur Reifung der Peptidoglykan-Struktur notwendige Anlagerung der Transpeptidasen [165, 175].

Die folgende Grafik zeigt den schematischen Aufbau der bakteriellen Zellwand gram-positiver und gram-negativer Organismen:

Zellwand gram-positiver Organismen

Zellwand gram-negativer Organismen

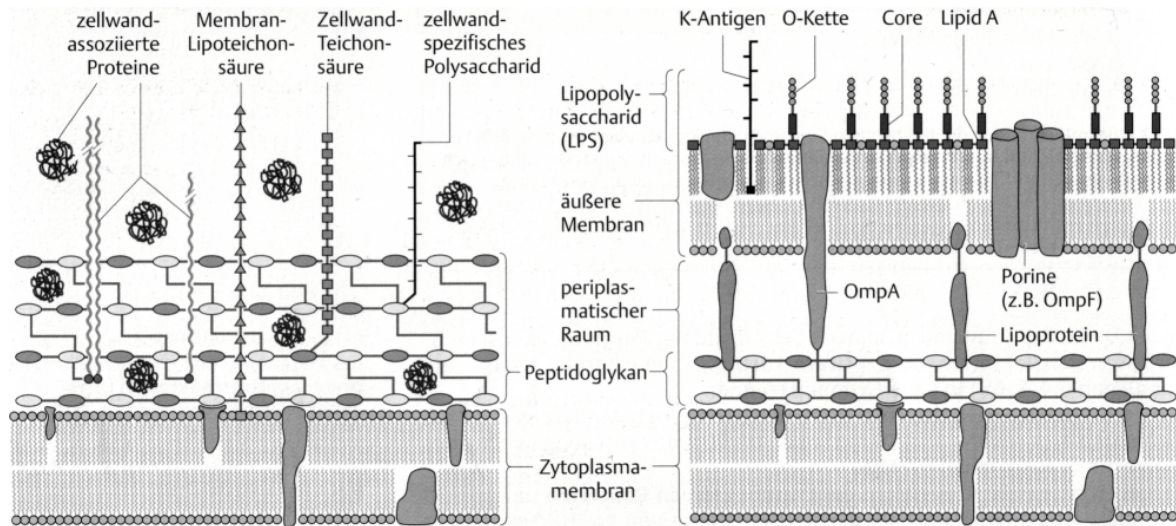


Abbildung 2 : Aufbau und Struktur der bakteriellen Zellwand. Links: gram-positiv, rechts: gram-negativ. Quelle: modifiziert nach [69]

1.1.2 Membranwirksame Antibiotika

Antibiotika aus der Gruppe der Polymyxine wirken auf die gut zugängliche bakterielle Zellmembran. Sie sind grenzflächenaktive Substanzen und erhöhen die Permeabilität der Zellwand. Dies führt zum Austritt des Cytoplasmas und dem Absterben der Bakterienzelle [105, 106].

1.1.3 Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerasen

Die Chinolone stellen die einzige Substanzklasse dar, die direkt die DNA-Synthese inhibieren. Die molekularen Wirkorte der Fluorchinolone sind die an der Replikation beteiligten Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV [71]. Sie binden an Komplexe aus DNA und Gyrase bzw. DNA und Topoisomerase IV. DNA, Enzym und Antibiotikum bilden einen irreversiblen Komplex, der die bakterielle Replikation stoppt und letale Wirkung hat.

1.1.4 Inhibitoren der Folsäuresynthese

Zu den Inhibitoren der Folsäuresynthese gehört die Substanzklasse der Sulfonamide und Trimethoprim. Durch die Hemmung der Folsäuresynthese erzielen sie eine bakteriostatische Wirkung [158].

Die Sulfonamide werden während der Folsäuresynthese anstelle der p-Aminobenzoesäure für diese Synthese verwendet und wirken somit inhibierend. Trimethoprim erzielt ebenfalls durch die Hemmung der Folsäuresynthese eine bakteriostatische Wirkung. Trimethoprim erzielt den hemmenden Effekt durch die Bindung an die Dihydrofolsäurereduktase. Dadurch wird die enzymatische Reduktion der Dihydrofolsäure zu der Tetrahydrofolsäure verhindert [158, 168].

1.1.5 Der Transkriptionsinhibitor Rifampicin

Rifampicin ist ein spezifischer Inhibitor der bakteriellen mRNA-Synthese. Die Hemmung der Transkription erfolgt über die Anlagerung von Rifampicin an die beta-Untereinheit der RNA-Polymerase. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Komplexes aus DNA und RNA-Polymerase und hemmt die katalytische Aktivität der RNA-Polymerase. Dadurch wird die bakterielle mRNA-Synthese und die anschließende ribosomale Proteinsynthese inhibiert [119].

1.1.6 Inhibitoren der bakteriellen Translation

Die Wirkung translationshemmender Substanzen hängt von der Struktur des Ribosoms, seiner Untereinheiten und der Funktion einzelner Komponenten während der Translation ab. Die Skizzierung der ribosomalen Struktur, die Mechanismen der Translation und die daran beteiligten Komponenten, sowie einige strukturelle Besonderheiten werden daher vor der Klassifizierung der Antibiotika behandelt.

1.1.6.1 Aufbau des bakteriellen Ribosoms

Das bakterielle 70S-Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, einer kleineren 30S- und einer größeren 50S-Untereinheit. Die 30S-Untereinheit setzt sich aus einem großen rRNA-Molekül, der 16S-rRNA, sowie 21 Proteinen zusammen. Die 50S-Untereinheit besteht aus zwei rRNA-Molekülen, der 5S-rRNA und der 23S-rRNA sowie 34 ribosomalen Proteinen:

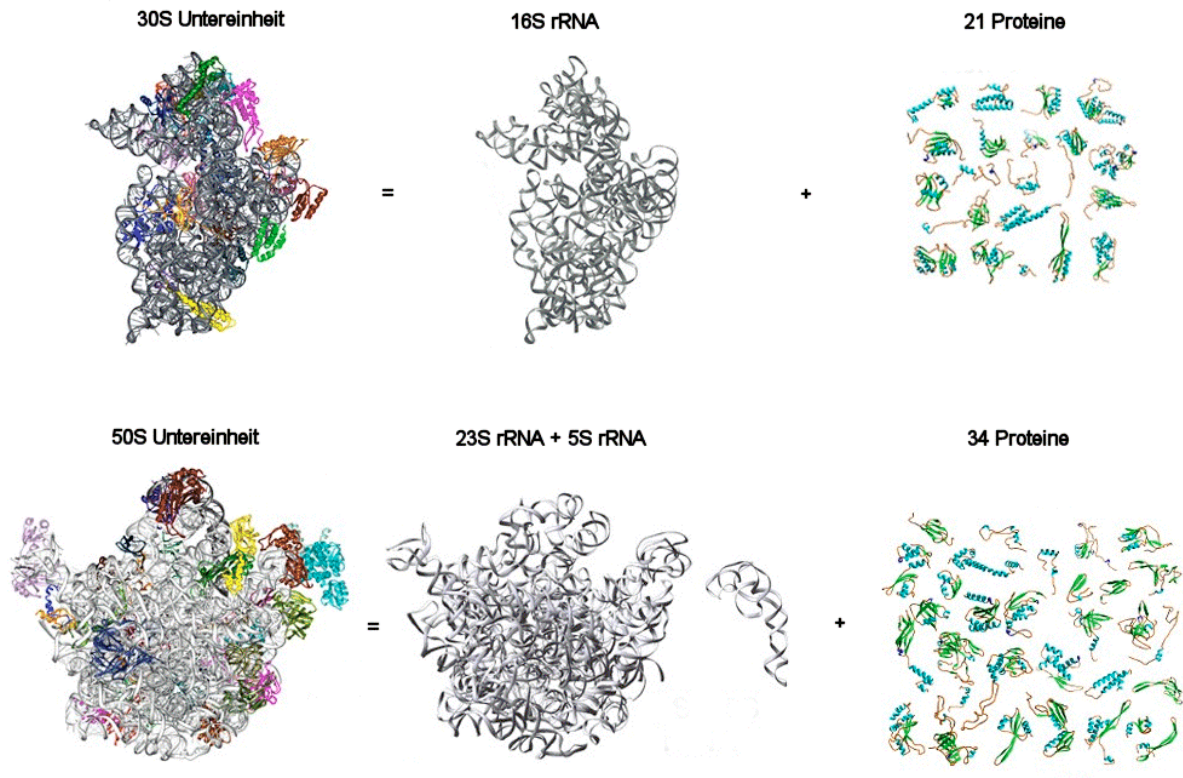


Abbildung 3: Die Bestandteile der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit. Quelle: modifiziert nach [9, 62, 181]

1.1.6.2 Die Struktur der ribosomalen RNA

Die übliche zweidimensionale Darstellung der rRNA spiegelt die oben dargestellte räumliche Verteilung innerhalb des Ribosoms nur sehr bedingt wieder. Die traditionelle Domänen-Darstellung der ribosomalen RNA lässt weder die Proteinbindestellen der RNA-Moleküle noch die übergeordnete Vernetzung der rRNA-Domänen untereinander erkennen. Die Domänen-Darstellung stellt die Sequenz der rRNA und deren sekundäre Struktur dar. Die beiden folgenden Domänen-Darstellungen der 23S-rRNA zeigen die konservierten Basensequenzen der 5'-Hälfte und 3'-Hälfte der 23S-rRNA von 42 Sequenzen aus eukaryotischen Organismen, Archebakterien, Eubakterien und Chloroplasten [42, 43]:

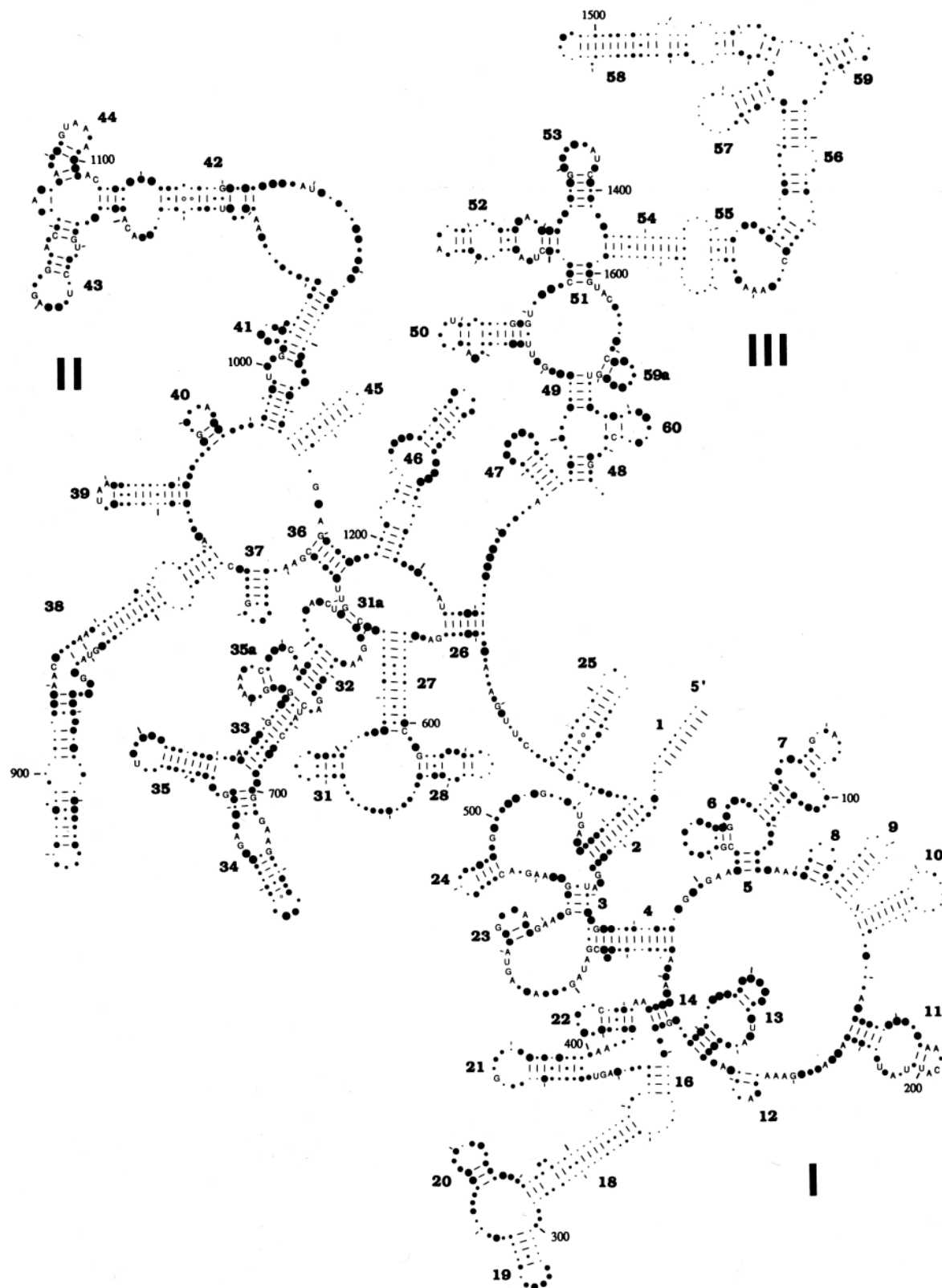


Abbildung 4: Konservierte Basensequenzen der 5' Hälfte der 23S-rRNA. Die Abbildung zeigt den Grad der Konservierung der 23S-rRNA Nukleotide unter 42 verglichenen Sequenzen aus eukaryotischen Organismen, Archebakterien, Eubakterien und Chlorplasten. Die Kennzeichnung einzelner Basen zeigt eine invariante Base an dieser Position an. Die mit Punkten angegebenen Basen zeigen den Grad der Konservierung durch die Größe des jeweiligen Punktes an. Quelle: [42]

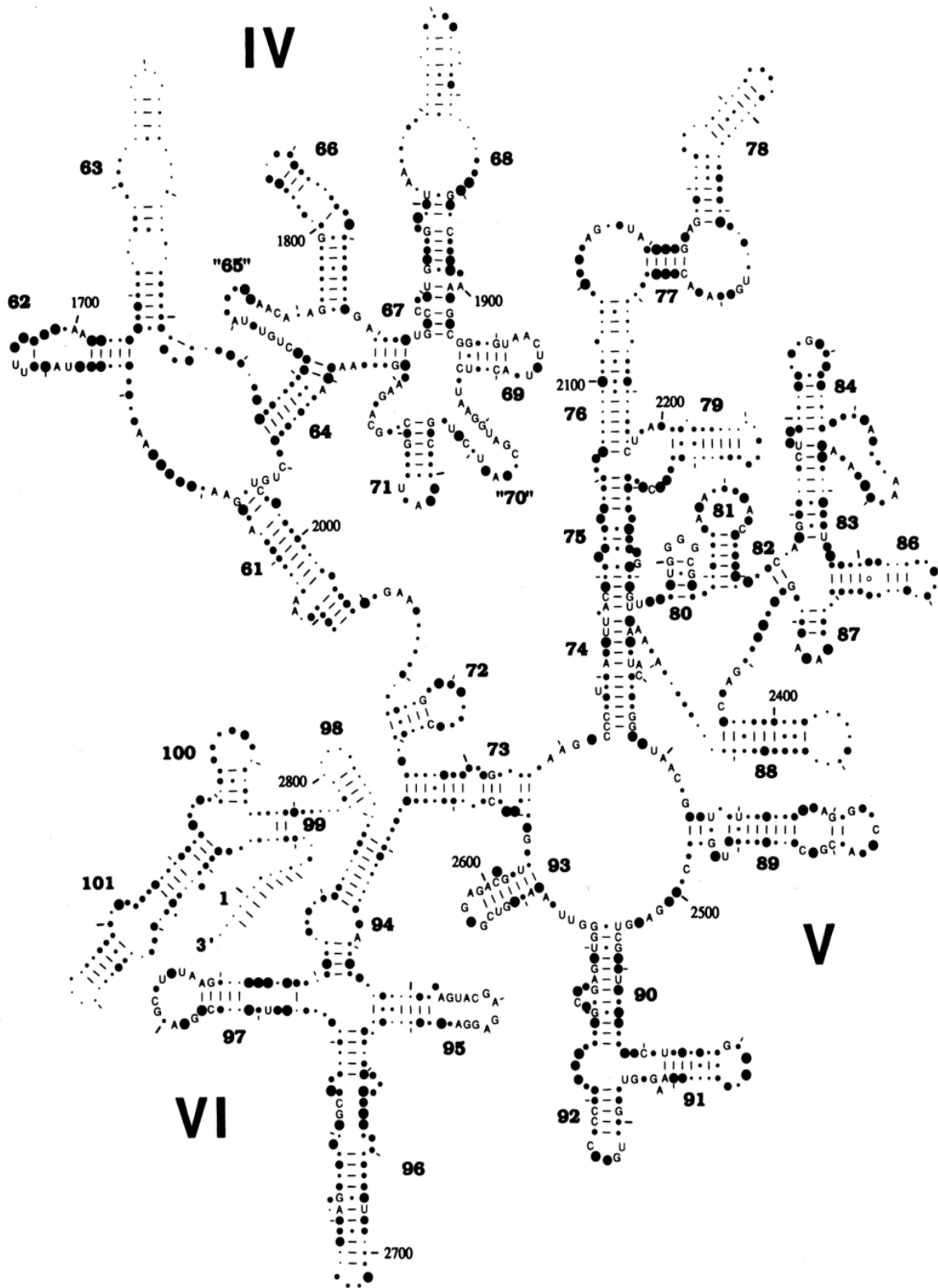


Abbildung 5: Konservierte Basensequenzen der 3'-Hälfte der 23S-rRNA. Die Abbildung zeigt den Grad der Konservierung der 23S-rRNA Nukleotide unter 42 verglichenen Sequenzen aus eukaryotischen Organismen, Archebakterien, Eubakterien und Chloroplasten. Die Buchstaben-Kennzeichnung einzelner Basen zeigt eine invariante Base an dieser Position an. Die mit Punkten angegebenen Basen zeigen den Grad der Konservierung durch die Größe des jeweiligen Punktes an. Quelle: [43]

Auffällig an beiden Darstellungen ist der hohe Grad der Konservierung der ribosomalen RNA. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung der Domäne V auf der 3' Hälfte der ribosomalen 23S-rRNA. Dieser Bereich zeigt einen extrem hohen Anteil konservierter Nukleotide in allen untersuchten Spezies. Es handelt sich um das Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms, den zentralen Bereich der bakteriellen Translation und Angriffspunkt vieler ribosomal wirksamer Antibiotika [22, 23, 51, 75, 156, 182].

1.1.6.3 Posttranskriptionelle Modifikationen der ribosomalen RNA

Die Ausbildung der für die Translation erforderlichen rRNA-Sekundärstrukturen erfordert eine hohe Konservierung der rRNA-Basensequenzen. Darüber hinaus sind posttranskriptionelle Modifikationen der rRNA wie die Basenmethylierung oder die Synthese von Pseudouridinen aufgrund funktionaler Erfordernisse ebenfalls hoch konserviert [55, 60, 91, 120, 134, 135] und treten häufig in einzelsträngigen, hoch konservierten Bereichen der ribosomalen RNA auf. Eine Untersuchung von posttranskriptionellen Modifikationen innerhalb der ribosomalen A-Site der 23S-rRNA aus den Organismen *Haloarcula marismotui*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus* hat gezeigt, dass sowohl posttranskriptionelle Methylierungen, als auch die Synthese von Pseudouridinen in diesen Organismen bekannt sind. Die Distribution der Modifikationen in unmittelbarer Nähe des ribosomalen Peptidyltransferasezentrums und deren räumliche Lage innerhalb des Ribosoms unterstützen dabei die Vermutung, dass posttranskriptionelle Modifikationen der ribosomalen RNA funktionell bedeutend sind [60].

Die Resistenz gegenüber vielen ribosomal wirksamen Antibiotika wird durch posttranskriptionelle Methylierungen der ribosomalen RNA vermittelt [12, 22, 60, 110, 115, 177].

Die posttranskriptionelle Synthese von Pseudouridinen in ribosomaler RNA trägt erheblich zur Stabilität von helikalen RNA-Strukturen bei [95, 96]. Die posttranskriptionelle Synthese von Pseudouridinen senkt zudem den hydrophoben Charakter der rRNA-Basen [37]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Vermutung geäußert, dass die Pseudouridine der 23S-rRNA eine Rolle in der Peptidyltransferase-Reaktion spielen [95, 96].

Die folgenden Abbildung zeigt anhand der 23S-rRNA in *E. coli* die Lage der Pseudouridine sowie die entsprechenden Synthasen:

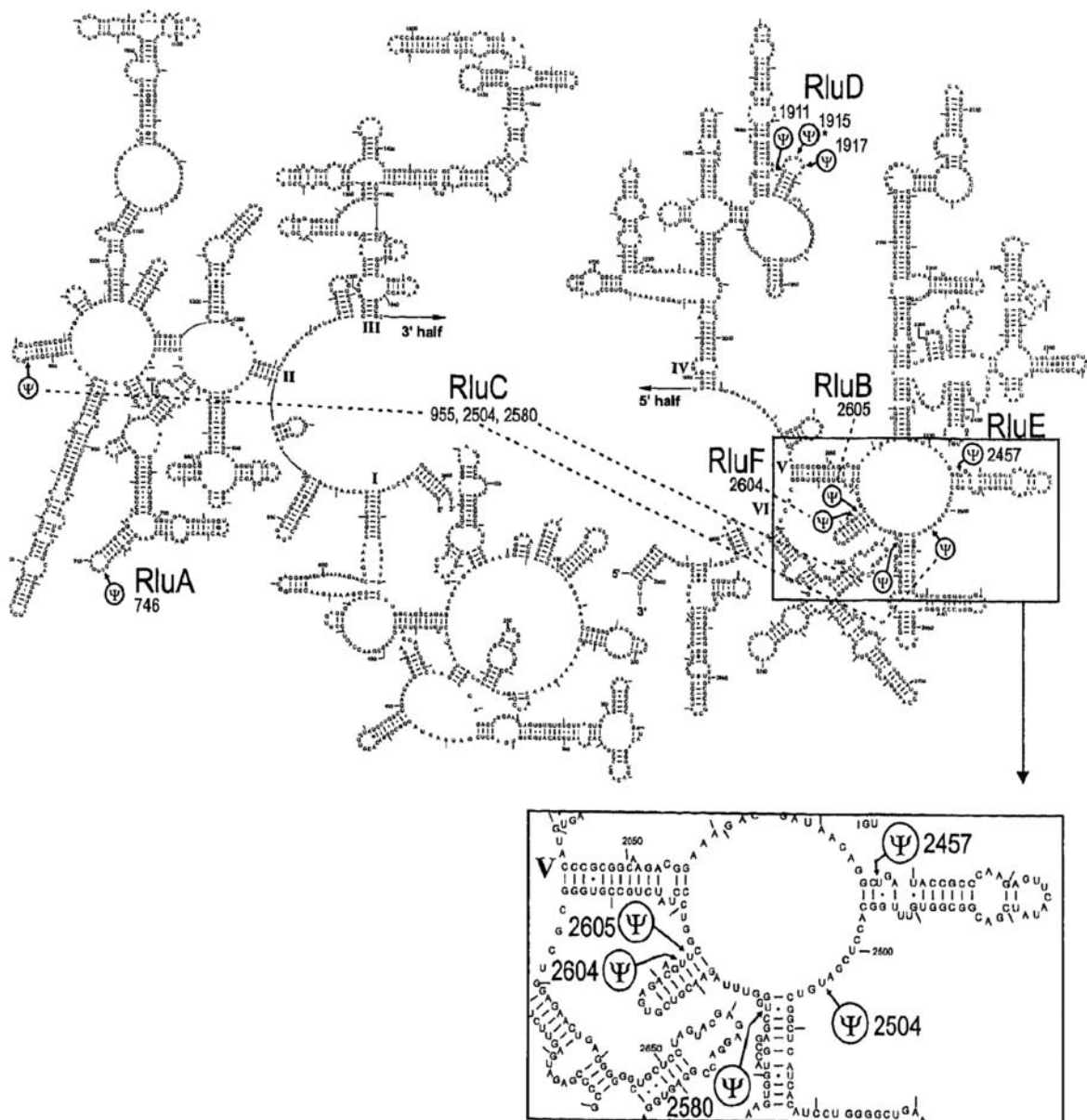


Abbildung 6: Position der 23S-rRNA-Pseudouridine in *E. coli*. Quelle: [38]

Abbildung 6 zeigt, dass die Synthese der 23S-rRNA Pseudouridine in *E. coli* gehäuft um das Peptidyltransferasezentrum erfolgt. Abbildung 7 zeigt anhand einer *E. coli* tRNA die Lage der Pseudouridine sowie deren Synthasen:

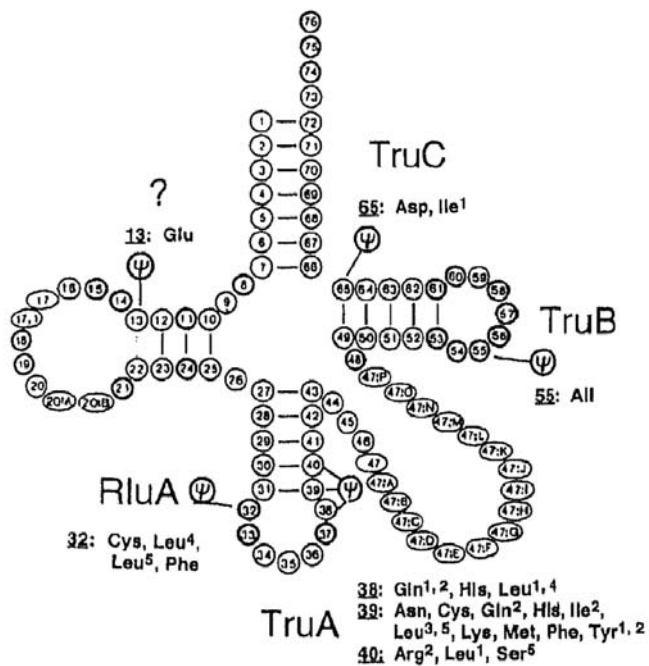


Abbildung 7: Position der tRNA-Pseudouridine in *E. coli*.
Quelle: [38]

Die folgende Tabelle zeigt die zehn in *E. coli* bekannten Pseudouridinsynthesen. Diese werden aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien zu Familien zusammengefasst [38, 72, 139]:

Familie	Synthase	Substrat
RsuA	RsuA	16S-rRNA
	RluB	23S-rRNA
	RluE	23S-rRNA
	RluF	23S-rRNA
RluA	RluA	23S-rRNA, tRNA
	RluC	23S-rRNA
	RluD	23S-rRNA
	TruC	tRNA
TruB	TruB	tRNA
TruA	TruA	tRNA

Tabelle 2: Die Pseudouridinsynthesen in *E. coli*.

1.1.6.4 Posttranslationale Modifikationen der ribosomalen Proteine

Zusätzlich zu posttranskriptionellen Modifikationen ribosomaler RNA werden mindestens 10 Proteine der großen ribosomalen Untereinheit methyliert, unter anderem das Protein L3. Ein mutanter *E. coli* Stamm, der nicht in der Lage ist das Protein L3 zu methylieren zeigt bei niedrigen Temperaturen deutliche Defizite in der Ribosomen-Zusammenlagerung sowie eine verminderte Wachstumsrate [33, 66]. Die ribosomalen Release-Faktoren RF-1 und RF-2 werden ebenfalls posttranslational methyliert. Betroffen ist die Aminosäure Glutamin im Tripeptid G-G-Q beider Release-Faktoren. Deletionsmutanten der entsprechenden Methylasen zeigen ein deutlich verringertes Zellwachstum in Vollmedium [5, 7].

1.1.6.5 Die bakterielle Translation

Der normale Ablauf der bakteriellen Translation ist in die drei Phasen der Initiation, Elongation und Termination gegliedert.

1.1.6.5.1 Die Initiation der bakteriellen Translation

Der 30S Initiationskomplex besteht aus der 30S ribosomalen Untereinheit, mRNA, einer formylierten Methionin-tRNA ($tRNA^{fMet}$) und den Initiationsfaktoren IF-1, IF-2 und IF-3. Während der Bildung des Initiationskomplexes binden zuerst $tRNA^{fMet}$ und die mRNA an den 30S Initiationskomplex [188]. Die Bindung der Initiationsfaktoren beeinflusst die Kinetik des 30S Initiationskomplexes und erhöht seine Stabilität. Die Bindung des kleinsten Initiationsfaktors IF-1 stimuliert die Aktivität von IF-2 und IF-3 auf die Bildung des 30S Initiationskomplexes. Zusätzlich moduliert IF-1 die Interaktion von IF-2 mit der 30S-Untereinheit des Ribosoms durch Erhöhung der Bindungsaffinität [54]. Während der Initiation bindet IF-1 an die ribosomale A-Site an der gleichen Position wie die Anticodon-Domäne der tRNA während der Elongation. Dies impliziert den Schutz der A-Site vor der vorzeitigen Bindung von Aminoacyl-tRNAs während der Initiation. IF-2, der größte der drei Initiationsfaktoren ist essentiell für die Initiation der bakteriellen Translation. IF-2 fördert die Bindung von $tRNA^{fMet}$ an die P-Site des Ribosoms durch die spezifische Erkennung der blockierten Aminogruppe von $tRNA^{fMet}$ und diskriminiert somit die Bindung von Elongator-tRNAs [63].

IF-2*GTPase stimuliert die Bindung der ribosomalen 50S- und 30S-Untereinheiten zum funktionellen 70S-Ribosom.

Während der Zusammenlagerung der beiden ribosomalen Untereinheiten werden IF-1 und IF-3 abgetrennt sowie das GTPase-Zentrum von IF-2 aktiviert. IF-2 ist für die korrekte Ausrichtung der tRNA^{fMet} in der ribosomalen P-Site erforderlich. Die GTP-Hydrolyse und/oder das Vorhandensein von mRNA sind für diesen Prozess notwendig. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP wird auch der Initiationsfaktor IF-2 abgetrennt [93]. Zu diesem Zeitpunkt liegt die tRNA^{fMet} in der ribosomalen P-Site. Der Eintritt in die Elongationsphase durch Ausbildung der ersten Peptidbindung mit der zweiten Aminoacyl-tRNA in der ribosomalen A-Site kann somit erfolgen [93, 164].

IF-3 besitzt vermutlich eine Doppelfunktion während der Initiationsphase der Translation: Durch Bindung an die 16S-rRNA der 30S-Untereinheit stimuliert IF-3 die Dissoziation inaktiver 70S-Ribosomen und führt die Untereinheiten damit erneut der Initiation zu (Ribosomen-Recycling). Darüber hinaus wird spekuliert, dass IF-3 den Anticodonbereich der Initiator-tRNA erkennt und dadurch die Bindung von Elongator-tRNA an den 30S Initiationskomplex verhindert [63].

1.1.6.5.2 Die Elongation der bakteriellen Translation

Während der Elongationsphase der bakteriellen Proteinbiosynthese erfolgt ein unidirektionaler Transport einer tRNA von der Akzeptor-Site (A-Site) über die Peptidyl-Site (P-Site) zur Exit-Site (E-Site) [85, 86, 185, 186].

Während jedes Zyklus der Peptidketten-Verlängerung beliefert der Elongationsfaktor EF-Tu als GTP-Komplex die A-Site des Ribosoms mit einer Aminoacyl-tRNA. GTP wird hydrolysiert und der EF-Tu-GDP Komplex löst sich vom Ribosom. Footprinting-Untersuchungen haben dabei ergeben, dass EF-Tu eine Bindung mit der 23S-rRNA in der Domäne VI der 23S-rRNA an Position 2655 und 2661 eingeht [121]. Im zweiten Schritt erfolgt der Peptidyl-Transfer. Dabei bindet die Aminoacyl-tRNA an der A-Site die Peptidyl-Gruppe einer an der P-Site gebundenen Peptidyl-tRNA.

Im dritten Schritt beendet der EF-G*GTP Komplex den Elongationszyklus indem er die Translokation der so neu gebildete Peptidyl-tRNA von der A-Site zur P-Site katalysiert. Gleichzeitig wird die deacetylierte tRNA aus der P-Site zur E-Site verlagert. Von dort aus wird die deacetylierte tRNA an das Cytoplasma abgegeben. Wie EF-Tu geht auch EF-G eine Bindung mit der 23S-rRNA in der Domäne IV der 23S-rRNA ein.

Die Bindung an die 23S-rRNA erfolgt an der Position 2660, also in unmittelbarer Nähe der EF-Tu Bindungsstelle. Darüber hinaus bindet EF-G ebenfalls in der Domäne II der 23S-rRNA an Position 1067 [121].

1.1.6.5.3 Die Termination der bakteriellen Translation

Nach Abschluss der Translation eines Proteins und dem Erreichen des Stop-Codons der translatierten mRNA bindet das Ribosom die Release-Faktoren RF-1 und RF-2 in der A-Site des Ribosoms. RF-1 erkennt dabei die auf der mRNA kodierten Stop-Codons UAA und UAG, RF-2 erkennt die Codons UAA und UGA. Durch die Bindung der Release-Faktoren erfolgt die Abtrennung der translatierten Polypeptidkette von der Peptidyl-tRNA durch Hydrolyse. Der Release-Faktor RF-3 katalysiert dann die Dissoziation der Release-Faktoren RF-1 und RF-2. Der verbleibende Postterminations-Komplex besteht zu diesem Zeitpunkt aus dem 70S-Ribosom, der translatierten mRNA und einer deacetylierten tRNA in der P-Site. Mittels des ribosomalen Recycling-Faktors RRF und des Elongations-Faktors G (EF-G) wird der postterminale Ribosomenkomplex in seine Untereinheiten zerlegt und für den nächsten Durchlauf der Proteintranslation vorbereitet [66, 94].

1.1.6.6 Inhibitoren der bakteriellen Translation

Die direkten Inhibitoren der Proteinbiosynthese lassen sich funktional in Substanzen mit Wirkung auf die 30S-Untereinheit des Ribosoms, der 50S-Untereinheit und Inhibitoren der Elongationsfaktoren unterscheiden.

1.1.6.7 Inhibitoren der ribosomalen 30S-Untereinheit

Die Aminoglykoside, Tetrazyklin und Spectinomycin gehören zu den Substanzen mit primärer Wirkung auf die 30S-Untereinheit des Ribosoms:

- Die **Aminoglykoside** binden mit hoher Affinität an den 30S-Initiationskomplex (30S-mRNA-tRNA) des Ribosoms, so dass keine weitere Zusammenlagerung zum funktionellen 70S-Ribosom erfolgen kann. Darüber hinaus verlangsamen die Aminoglykoside die bereits initiierte Proteinsynthese funktioneller Ribosomen und induzieren Fehlablesungen der mRNA. Vertreter der Aminoglykosid-Antibiotikagruppe sind Kanamycin, Neomycin und Streptomycin [12, 119, 146].
- **Tetrazyklin** bindet ebenfalls an die 30S-Untereinheit des Ribosoms und stört die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-Site des 70S-Ribosoms. Die Aminoacyl-

tRNA ist dadurch nicht in der Lage, in die korrekte Orientierung zu gelangen, um eine Peptidbindung zu ermöglichen [77, 146, 177].

- **Spectinomycin** stört die Translokation der Peptidyl-tRNA von der A-Site zur P-Site [77, 156].

1.1.6.8 Inhibitoren der ribosomalen 50S-Untereinheit

Zu den Substanzklassen, die an der 50S-Untereinheit des Ribosoms wirken, gehören die Makrolide, Ketolide, Lincosamide, Streptogramine und Chloramphenicol.

- Die **Makrolid-Antibiotika** inhibieren die Proteinsynthese während der Elongationsphase. Die Leitsubstanz dieser Klasse ist Erythromycin. Durch die Bindung im aktiven Zentrum der 50S-Untereinheit blockieren die Makrolid-Antibiotika die Translokation der Peptidyl-tRNA von der A-Site zur P-Site. Das Ribosom kann einige Peptide miteinander verknüpfen, bevor die wachsende Peptidkette blockiert wird [22, 26, 41, 116].
- Die **Lincosamide** unterscheiden sich zwar strukturell erheblich von den Makroliden, die Wirkung weist jedoch große Ähnlichkeit zu den Makrolid-Antibiotika auf [22, 31, 177].
- Die Gruppe der **Streptogramine** besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen Substanzen, Typ A und Typ B. Durch synergistische Bindung an die 50S-Untereinheit des Ribosoms erzielen diese Substanzen eine Inhibierung der bakteriellen Translation [31, 77, 79].
- Die **Ketolide** sind teilsynthetische Derivate der Makrolid-Antibiotika [23, 154]. Sie weisen an Position 3 des Makrolaktonrings eine Ketogruppe auf. Ketolide zeigen im Vergleich zu den Makroliden eine bessere Wirkung bei niedrigerer Konzentration. Die Gruppe der Ketolidantibiotika ist im Gegensatz zu den Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B in der Lage, an die ribosomale RNA zu binden, ohne die Expression resistenzvermittelnder Methylasen zu induzieren [18, 30, 41]. Darüber hinaus behindern sie die Zusammenlagerung der ribosomalen 50S-Untereinheit [18, 23, 25, 30, 32, 41, 154].
- **Chloramphenicol** besetzt die Stelle der ersten Aminosäure in der 50S-Untereinheit des Ribosoms und inhibiert so die Peptidyltransferase-Reaktion [77, 177].
- Die **Oxazolidinone** bilden eine neue Klasse von Antibiotika. Die Wirkung dieser Substanzklasse beruht auf der Inhibierung der Proteinbiosynthese. Die zu den

Oxazolidinonen gehörenden Substanzen Linezolid und Eperezolid binden an die 50S-Untereinheit des Ribosoms. Bindungsexperimente haben gezeigt, dass die Bindung an das Ribosom von Chloramphenicol und Lincomycin kompetitiv inhibiert wird [103]. Durch Crosslinking-Experimente in *E. coli* konnte zudem gezeigt werden, dass die Oxazolidinone sowohl an Position A864 der 16S-rRNA, als auch an den Positionen U2113, A2114, U2118, A2119 und C2135 des Peptidyltransferasezentrums der 23S-rRNA binden [11, 75, 103].

1.2 Antibiotikaresistente Pathogene und die Notwendigkeit neuer Antibiotika

Die Entwicklung und Anwendung von Antibiotika hat die Eindämmung und Kontrolle vieler infektiöser Erkrankungen ermöglicht. Die intensive Nutzung dieser Substanzen hat jedoch zur raschen Verbreitung von antibiotikaresistenten Pathogenen geführt [106, 144]. Dadurch bleibt die Antibiotika-Therapie immer öfter ineffektiv. Bei Krankenhausinfektionen sind Staphylokokken und Enterokokken die häufigsten Pathogene. Die erhöhte Resistenz dieser gram-positiven Kokken gegenüber gebräuchlichen Antibiotika stellt nicht nur im Krankenhaus ein erhebliches Risiko für Patienten dar [122, 123]. Als weitere Folge der Antibiotika-Resistenz können sich Krankheiten wie Tuberkulose in Ländern verbreiten, in denen diese Krankheiten seit Generationen nicht mehr beobachtet wurden. Klinische *Staphylococcus aureus* Isolate zeigen häufig eine Resistenz gegen Methicillin bzw. Oxacillin. Immer häufiger zeigen *Staphylococcus aureus* Stämme zudem eine erhöhte Resistenz gegen weitere Antibiotika. Das Reserveantibiotikum Vancomycin ist bei der Behandlung von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Erregern bisher das Mittel der Wahl. Intermediär Vancomycin-resistente *S. aureus* Erreger wurden jedoch bereits in Kliniken isoliert und legen den Verdacht nahe, dass in Zukunft auch mit vollständig Vancomycin-resistenten *S. aureus* Stämmen gerechnet werden muss. Bei den meisten *Enterococcus* Spezies sind bereits Vancomycin-resistente Stämme bekannt [145]. Es besteht daher dringender Bedarf an neuen Antibiotika, die keine Kreuzresistenz mit anderen Substanzklassen zeigen [14, 183].

1.2.1 Die genetische Grundlage der Antibiotika-Resistenz

Grundsätzlich werden verschiedene genetisch bedingte Arten der erworbenen Antibiotika-Resistenz unterschieden [106, 111]. Der horizontale Gentransfer beruht auf der Übertragung von Antibiotika-Resistenzgenen zwischen Bakterienstämmen durch Plasmide oder Transposons [21, 74]. Transposons ermöglichen die Integration von Resistenzgenen in andere Plasmide oder in das bakterielle Genom. Einige dieser Transposons sind zwischen verschiedenen Bakterienspezies übertragbar.

In gram-negativen Organismen existieren darüber hinaus plasmidkodierte Integrons. Diese natürlichen Rekombinationssysteme ermöglichen die Ansammlung und Expression verschiedener Resistenzgene hinter einem einzelnen Promotor. Die Übertragung von Resistenzgenen für Sulfonamide, Streptomycin, β -Lactame und viele Aminoglykosid modifizierende Enzyme erfolgt auf diesem Weg [58, 59].

In *Staphylococcus* Stämmen wurde zudem die Übertragung von Resistenzgenen durch lysogene Bakteriophagen postuliert [104]. Rekombinationsereignisse ermöglichen den Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch den Einbau fremder DNA in das bakterielle Chromosom [36]. Neben Erwerb und Austausch von Antibiotika-Resistenzgenen durch die oben genannten Ursachen bilden Mutationen chromosomaler Loci eine weitere Grundlage der bakteriellen Antibiotika-Resistenz. Die Mutationsrate wird als die Frequenz definiert, mit der *in vitro* bei einer gegebenen Antibiotikumkonzentration in einer Bakterienpopulation Resistenzmutanten auftreten. Gezählt werden hierbei nicht die Mutationsereignisse, sondern die Anzahl antibiotikaresistenter Keime. Dieses indirekte System erfasst daher nur Mutationsereignisse, die unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums zu einer Erhöhung der Resistenz führen [111]. Der Mutationsprozeß innerhalb einer Bakterienpopulation ist jedoch kein statisches Ereignis, sondern ist von vielfältigen Faktoren abhängig. Die Antibiotikumkonzentration während des Selektionsprozesses [89], physiologische Faktoren wie die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle [73] sowie bakterielle Stressfaktoren [46, 155] können die Mutationsrate beeinflussen.

Während der bakteriellen Replikation treten zufällige Basensubstitutionen auf. Die Mutationsfrequenz der α -Untereinheit der Polymerase III in *E. coli* beträgt während der Replikation 10^{-4} bis 10^{-5} Ereignisse pro Base. Die 3' - 5' Exonuklease-Aktivität der ϵ -Untereinheit der Polymerase III reduziert die Fehlerrate auf 10^{-6} bis 10^{-7} Ereignisse pro replizierter Base.

Die post-replikative Korrektur von Basenfehlpaarungen reduziert die Mutationsrate in *E. coli* auf weniger als 10^{-9} Ereignisse pro replizierter Base. Kopierfehler können darüber hinaus zur partiellen oder kompletten Deletion einzelner Gene führen. Durch das Abschalten der während der DNA-Replikation stattfindenden Fehlerkorrektur der DNA-Polymerase kann die Mutationsrate der Bakterien jedoch unter Antibiotika-Einwirkung bis zu 200-fach gesteigert werden [21]. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Mutation, die zu einer erhöhten Antibiotika-Resistenz führt. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Mutationsrate besteht in der Induktion des bakteriellen SOS-Systems. Während dieser zellulären Stressantwort auf Umweltfaktoren werden alternative DNA-Polymerasen mit verringerter Kopiergenauigkeit exprimiert [148].

1.2.2 Die bakteriellen Systeme der Antibiotika-Resistenz

Bakterien besitzen verschiedenartige Möglichkeiten, eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika zu erlangen. Im klinischen Umfeld erfolgen Entstehung und Verbreitung bakterieller Antibiotika-Resistenzen unter Selektionsdruck [14, 107]. Systematisch werden folgende Methoden der Resistenzentwicklung unterschieden:

1.2.2.1 Verringerte Substanzaufnahme

Durch eine Veränderung der Zellmembran-Permeabilität [45, 68, 105], eine Verdickung der Zellwand [105, 119, 175] oder das Abschalten eines aktiven Transportmechanismus [6, 68, 104, 142, 143] kann die Aufnahme von Antibiotika gesenkt werden. Bei gram-negativen Organismen gibt es darüber hinaus noch die Möglichkeit, zusätzlich die in der äußeren Zellmembran liegenden Transporter abzuschalten [144].

1.2.2.2 Aktiver Substanzexport

Der vermehrte Export des Antibiotikums aus der Zelle heraus erfolgt durch Modifikation oder verstärkte Expression zellulärer Efflux-Systeme [102, 106, 108, 146]. In klinischen Isolaten antibiotikaresistenter Bakterienstämme wurden in den letzten Jahren vermehrt Efflux-Pumpen identifiziert, die durch aktiven Transport der Antibiotika aus den Bakterienzellen heraus die Resistenz der Bakterienstämme bedingen [90, 123, 174, 177].

Das Phänomen des Antibiotika-Efflux wurde 1980 erstmals im Zusammenhang mit der Tetrazyklin-Resistenz in Enterobakterien erkannt [102, 108].

Es gibt verschiedene Efflux-Systeme, die - auch kombiniert - in Bakterienstämmen vorkommen können. Dies ermöglicht eine erhöhte Resistenz gegenüber vielen Antibiotika-Klassen [137]. Einige Efflux-Pumpen exportieren nur spezifische Antibiotika-Klassen, während die MDR-Efflux-Pumpen (MDR= multi-drug resistance) Resistenz gegenüber mehreren, strukturell unterschiedlichen Antibiotika-Klassen vermitteln. Die Gene für MDR-Efflux-Pumpen wie z.B. NorA sind chromosomal kodiert. Die Efflux-Pumpen vom Typ MsrA werden hingegen von Plasmiden kodiert [115]. MsrA kodiert ein zytoplasmatisches Membranprotein, das den spezifischen Efflux von Makroliden und Streptograminen ermöglicht.

In jedem Fall wird die Antibiotika-Resistenz per Efflux-Mechanismus durch die (Über-) Expression der jeweiligen Pumpen verursacht. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick der in *Staphylococcus* identifizierten Efflux-Pumpen:

Pumpe	Lokation	Substrat
TetK-L	Plasmid, Transposon	Tetrazyklin
NorA	Chromosom	Ciprofloxacin, EtBr
QacA	Plasmid	QACs, EtBr, Proflavin
QacB	Plasmid	QACs, EtBr, Proflavin
QacC, D, G, H, Smr, Ebr	Plasmid	QACs, EtBr, Proflavin
MsrA, B	Plasmid	Makrolide, Streptogramin B

Tabelle 3: Efflux-Pumpen in *Staphylococcus*, Gen-Lokation und Substrat. Quelle: [90, 102, 108]

1.2.2.3 Inaktivierung antibakterieller Substanzen

Die Inaktivierung antibakteriell wirksamer Substanzen erfolgt durch enzymatische Modifikation oder Spaltung. Die β -Lactamasen inaktivieren die β -Lactam-Antibiotika durch die irreversible hydrolytische Spaltung des namensgebenden β -Lactamrings dieser Substanzklasse [84, 88, 136, 146, 169]. Bei gram-negativen Bakterien werden die β -Lactamasen in den periplasmatischen Raum sezerniert, bei gram-positiven Organismen erfolgt die Abgabe der β -Lactamasen in die Umgebung [88, 136, 169]. Die Resistenz gegenüber Chloramphenicol wird durch eine enzymatische Modifikation der Substanz selbst mittels einer Chloramphenicol-Acetyltransferase erzielt [177].

Die Resistenz gegenüber den Aminoglykosiden erfolgt ebenfalls durch modifizierende Enzyme [109].

Die Resistenz gegenüber Tetrazyklin wird durch zwei Resistenzgene vermittelt, tetM bzw. tetO. Diese Gene kodieren ribosomale Schutzproteine, die eine hohe Homologie zu den Elongationsfaktoren EF-G bzw. EF-Tu aufweisen. Beide besitzen zudem eine GTPase-Aktivität, welche benötigt wird, um Tetrazyklin vom Ribosom entfernen zu können [87, 177, 178].

1.2.2.4 Modifikation des antibakteriellen Wirkortes

Viele Antibiotika, deren Wirkort die bakterielle Translation ist, inhibieren die Peptidyltransferase-Aktivität des Ribosoms. Die Resistenzentwicklung gegenüber diesen Substanzen erfolgt entweder durch die Modifikation der Bindungsstelle, z.B. durch eine Methyltransferase oder eine Punktmutation der ribosomalen Komponente [12, 22, 60, 106, 110, 115, 177]. Die partielle Analyse der ribosomalen RNA sowie den ribosomalen Proteinen L22 und L4 in Methicillin resistenten *Streptococcus pneumoniae* Stämmen erbrachte als Ursache Mutationen sowohl der ribosomalen Proteine als auch der ribosomalen RNA [25].

1.3 Das Dipeptid-Antibiotikum TAN1057

Das Dipeptid-Antibiotikum TAN1057 ist ein aus dem gram-negativen Bodenbakterium *Flexibakter sp.* PK-74 und PK-176 isolierbarer Naturstoff. Die Isolation und Charakterisierung wurde 1989 [67] erstmalig beschrieben. TAN1057 inhibiert die bakterielle Translation [81] und zeigt eine exzellente antibakterielle Wirkung gegenüber Staphylokokken, einschließlich methicillinresistenter *S. aureus* Stämme.

1.3.1 Chemische Struktur, Eigenschaften und Synthese von TAN1057

Eingehende Untersuchungen zur Substanzstruktur haben ergeben, dass TAN1057 in vier verschiedenen Konformationen vorliegt [81], TAN1057A-D:

TAN1057A:

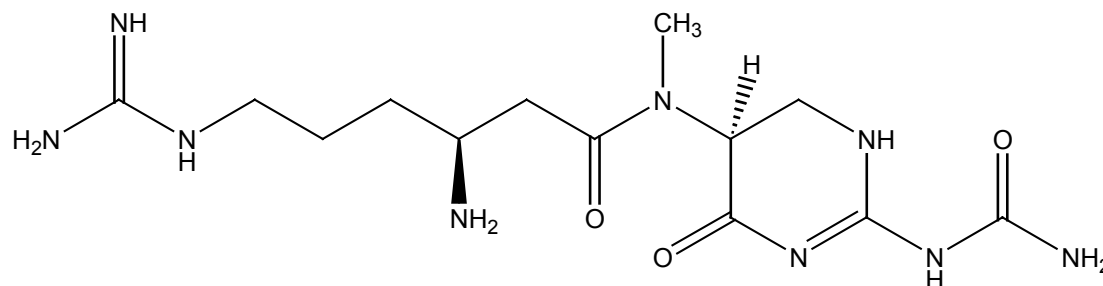


Abbildung 8: Substanzstruktur TAN1057A

TAN1057B:

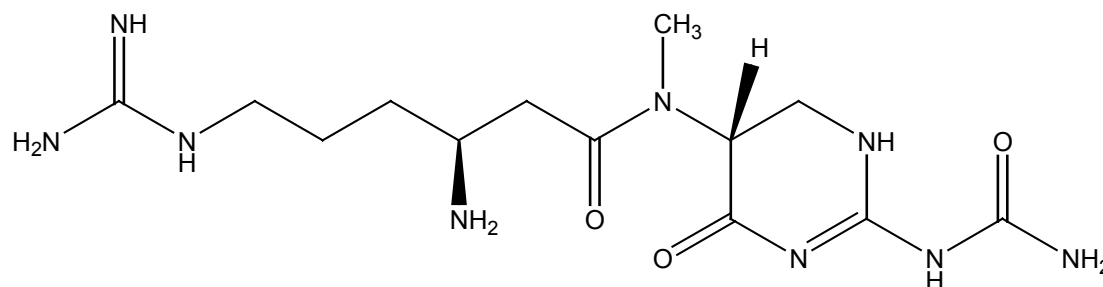


Abbildung 9: Substanzstruktur TAN1057B

TAN1057C:

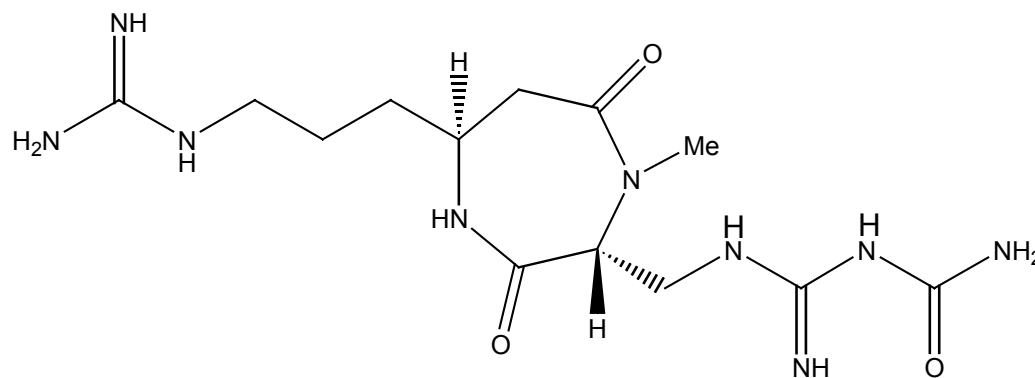


Abbildung 10: Substanzstruktur TAN1057C

erbrachten keine Anzeichen für eine Abnahme der biologischen Aktivität von TAN1057 innerhalb der entsprechenden Zeiträume.

TAN1057A und TAN1057B epimerisieren spontan in wässrigen Lösungen, so dass sich trotz einer spezifischen Synthese von TAN1057A in wässrigen Lösungen immer ein Gemisch von TAN1057A/B einstellt [17, 20]. Folglich wurden alle Experimente mit dem diastereomeren Gemisch aus TAN1057A und TAN1057B - im Weiteren als TAN1057 bezeichnet - durchgeführt.

1.3.2 Wirkspektrum und minimale Hemmkonzentration (MHK) von TAN1057

TAN1057A/B zeigt in Tiermodellen eine starke antibakterielle Aktivität gegen gram-positive Organismen wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* [19, 20, 47, 81]. In FKS-Medium und synthetischen Minimalmedien zeigt TAN1057A/B diese stark antibakterielle Wirkung auch *in vitro* gegen gram-positive Erreger. Die Aktivität gegen gram-negative Erreger ist sowohl im Tierversuch als auch *in vitro* deutlich geringer. Ausnahmen bilden einzelne mutante Bakterienstämme, wie der AcrAB pumpendefiziente *E. coli* Stamm HN818 [132].

Die in S-Konfiguration vorliegenden Substanzen TAN1057A und TAN1057D zeigen eine deutlich bessere antibakterielle Wirkung als TAN1057B und TAN1057C. TAN1057 zeigt zudem hervorragende Wirkung gegen MRSA-Keime [81].

Die *in vitro* Aktivität von TAN1057A/B ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen zeigt sich eine starke pH-Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung. Diese ist bei pH 9,0 um den Faktor 10 stärker als bei pH 7,0. Zum anderen ist die zur Hemmung des bakteriellen Wachstums benötigte Konzentration von TAN1057A/B sehr stark vom verwendeten Testmedium abhängig.

Die *in vitro* Aktivität von TAN1057A/B ist in synthetischen Minimalmedien erheblich stärker als in Standardmedien wie DYAB. Die Zugabe von Pepton oder Hefeextrakt zu Minimalmedien senkt die antibakterielle Wirkung von TAN1057A/B unter diesen Wachstumsbedingungen. Eine gute *in vitro* Aktivität wird ebenfalls in foetalem Kälberserum (FKS) erzielt. Die *in vivo* Aktivität von TAN1057A/B übertrifft in Mäusen sogar die der Antibiotika Vancomycin und Imipenem [81].

1.3.3 Der Wirkmechanismus von TAN1057

Aufgrund von *in vitro* Studien ist bekannt, dass TAN1057 die bakterielle Translation inhibiert. Die Inhibierung der Translation findet dabei erst nach der Initiation statt [81]. Untersuchte Derivate von TAN1057 zeigen eine Korrelation von minimaler Hemmkonzentration und Inhibierung der bakteriellen Translation [20]. TAN1057 beeinträchtigt *in vitro* sowohl die Proteinsynthese als auch die Formation der 50S ribosomalen Untereinheit [28]. Diese Kombination aus Inhibierung der Translation und der 50S-Synthese wurde schon bei anderen Antibiotika beobachtet [26, 27, 29, 31, 32]. TAN1057 inhibiert die Peptidyltransferasereaktion, wohingegen weder die Bindung von tRNA an die ribosomale A-Site und P-Site noch die Bindung der mRNA beeinträchtigt wird [17].

Zudem wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass TAN1057 aufgrund seiner Struktur sowohl mit der ribosomalen RNA als auch mit den ribosomalen Proteinen interagieren kann [28]. Über den Pyrimidin-Ring könnte TAN1057 demzufolge mit den übereinander liegenden RNA-Nukleotiden der rRNA interagieren. Eine Bindung ribosomalen Proteine könnte über die Seitenketten von TAN1057 erfolgen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die zunehmende Resistenz bakterieller Krankheitserreger gegenüber den heute gebräuchlichen Antibiotika-Klassen [14, 183] erfordert die Entwicklung neuer Substanzen ohne Kreuzresistenzen gegenüber gebräuchlichen Antibiotika-Klassen.

TAN1057 ist eine neue Substanz mit antibakterieller Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen Keime, die für einen großen Teil klinischer Infektionen verantwortlich sind [4]. Dazu zählen Methicillin resistente *S. aureus* Stämme (MRSA) sowie *Staphylococcus epidermidis* [20].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von TAN1057 auf *Staphylococcus aureus* durch die Analyse der bakteriellen Resistenzentwicklung untersucht. Dazu wurden gegenüber TAN1057 hoch resistente Keime selektioniert und eingehend analysiert. Dies ermöglichte die Untersuchung verschiedener Parameter von TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme im direkten Vergleich zu den TAN1057-sensitiven Ausgangsstämmen um grundlegende Faktoren der Resistenzentwicklung zu bestimmen.

Der Verlauf der TAN1057-Resistenzentwicklung von zwei *S. aureus* Stämmen sowie einem *E. coli* Stamm ermöglichte den Vergleich mit weiteren Resistenzentwicklungen gegenüber anderen Antibiotika. Die selektionierten TAN1057-resistenten Bakterienstämme wurden zudem auf die Stabilität der Resistenz untersucht.

Die Geschwindigkeit und Art der Resistenzentwicklung wurde charakterisiert, um die zur Resistenzentwicklung beitragenden, bakteriellen Veränderungen aufzuklären, um darüber ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus von TAN1057 zu erlangen. Darüber hinaus ergab sich so die Möglichkeit zu überprüfen, ob TAN1057-resistente Bakterienstämme Kreuzresistenzen gegenüber anderen Antibiotika aufweisen. So wurde geprüft, ob bei der TAN1057-Resistenzentwicklung bakterielle Systeme verändert worden sind, die sich auch auf die Sensitivität gegenüber anderen Antibiotika auswirken.

Die chromosomale DNA unterschiedlich TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme wurde mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese analysiert um zu klären, ob während der TAN1057-Resistenzentwicklung von *S. aureus* größere Veränderungen der chromosomale DNA erkennbar waren.

Der Wirkmechanismus von TAN1057 ist primär auf eine Beeinträchtigung der Translation zurückzuführen [17, 28]. Mit Hilfe eines *in vitro* Transkriptions-Translations Systems wurde geprüft, ob sich die Erhöhung der Resistenz von *S. aureus* gegenüber TAN1057 während der Resistenzentwicklung auch auf die Translation auswirkt.

Darüber hinaus wurden die zentralen Komponenten der großen ribosomalen Untereinheit von TAN1057-resistenten Keimen sequenziert. Dazu zählen alle Operons der 23S ribosomalen RNA sowie sämtliche L-Proteine der ribosomalen 50S-Untereinheit. Da vermutlich auch die Modifikationen der rRNA durch Pseudouridinsynthasen eine Rolle in der Peptidyltransferase-Reaktion spielt [95, 96], wurden die Pseudouridinsynthasen aus *S. aureus* ebenfalls sequenziert.

Die DNA-Sequenzen der rRNA bzw. der ribosomalen Proteine und der Pseudouridinsynthasen wurden bei einem der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme untersucht. Die Daten wurden mit denen des Wildtyps und den bisher veröffentlichten genomischen Sequenzen von *S. aureus* verglichen und auf Mutationen untersucht. Im Falle einer Divergenz der Sequenzdaten wurde die Sequenzierung wiederholt und zusätzlich mit denen TAN1057-resistenter Bakterienstämme aus unabhängigen Resistenzreihen verglichen.

2 Material

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Durchführung der Untersuchungen entsprechend den Herstellerangaben und im Rahmen der geltenden Sicherheitsbestimmungen verwendet:

2.1.1 Bestimmung von DNA/Proteinkonzentrationen

- MBA2000 Photometer, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA

2.1.2 Dichtebestimmung von Bakteriensuspensionen

- Pharmacia UltraSpecIII Photometer, Pfizer Inc., New York, NY, USA

2.1.3 Keimzahlbestimmung in Bakteriensuspensionen

- Neubauer Improved Haemocytometer, Brand GmbH, Wertheim

2.1.4 PCR

- GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA

2.1.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese

- Chef Mapper, BioRad, Hercules, CA, USA
- Variable Speed Pump, BioRad, Hercules, CA, USA

2.1.6 Scintillationszähler

- Wallac 1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA

2.1.7 Thermomixer

- Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
- Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg

2.1.8 UV-Visualisierungssysteme

- Reprostar II, CAMAG, Muttenz, CH
- Variocam, Polaroid Corporation, Waltham, MA, USA

2.1.9 Vakuumsysteme

- Speedvac Plus SC210A, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA

2.1.10 Visualisierung von DNA in Agarosegelen

Elektrophoresekammern:

- SubCell GT, GibcoBRL, Eggenstein
- Pharmacia HE 33, Pfizer Inc., New York, NY, USA

Stromquelle:

- 9009 TC, GibcoBRL, Eggenstein

2.1.11 Visualisierung von Proteinen in SDS/PAGE-Gelen

Elektrophoresekammer:

- PROT-RESOLV, Phase, Lübeck

Geltrockner:

- Gel Dryer 583, BioRad, Hercules, CA, USA

Stromquelle:

- Pharmacia ECPS 3000/150, Pfizer Inc., New York, NY, USA

2.1.12 Zellaufschluß

- French Press: French Pressure Cell Press, SLM/Aminco, Urbana, IL, USA
- Mini Pressure Cell, SLA/Aminco, Urbana, IL, USA
- 20000PSI Pressure Cell, SLA/Aminco, Urbana, IL, USA

2.1.13 Zentrifugen und Rotoren

- Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg
- Biofuge 15, Heraeus, Hanau
- L8-70M Ultracentrifuge, Rotor Ti70, Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
- J2-2 M/E, Rotoren JA 20.1, JA 18, Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
- Avanti J25, Rotoren JLA 10.500, JA 12, JA 17, Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA

2.1.14 Autoradiographie

- BioMax Belichtungskassetten, Kodak, Stuttgart
- BioMax TranScreen LE Verstärkerfolie, Kodak, Stuttgart
- Filmentwicklung: Curix 60, AGFA-Gevaert, B

2.1.15 Gerätezubehör

- Zentrifugen-Gefäße: 10 ml, 20 ml, 50 ml, 250 ml, 500 ml, Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
- Quarzglas-Küvetten: 50 µl, 1 ml, 2 ml, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA

2.2 Labormaterial

Folgende Materialien wurden für die Durchführung der Untersuchungen entsprechend den Herstellerangaben und im Rahmen der geltenden Sicherheitsbestimmungen verwendet:

2.2.1 Verbrauchsgüter

- 96-Loch Platten: Greiner Cellstar 96Well, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- 96-Loch Filterplatten: MultiScreen-HV-Opaque Plates, 0,45 µm, Millipore, Billerica, Mass., USA
- Cellophanfolie, BioRad, Hercules, CA, USA
- Filme zur Autoradiographie: BioMax MS Filme, Kodak, Stuttgart
- Impfösen steril, # 731170, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Küvetten, Kunststoff, 1 ml, 2 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Pipettenspitzen, 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 500 µl, 2,5 ml, Eppendorf, Hamburg
- Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Spritzen, Kunststoff, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Whatman Filterpapier, Whatman, Maidstone, Kent, UK
- Zentrifugationsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf, Hamburg
- Zentrifugationsgefäße, 15 ml, 50 ml, Becton Dickinson Labware, Lincoln Parc, USA

2.2.2 Kits

- High Pure PCR-Product Purification Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Qiagen Plasmid Maxi/Midi/Mini-Kit, Qiagen, Hilden
- QiaQuick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

2.2.3 Enzyme und Puffer

- Lysozym 10 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- Lysostaphin 10 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- Proteinase K, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- RNase A, Qiagen, Hilden
- Smal 20 U/ μ l, New England Biolabs, Beverly, USA
- Herculase enhanced DNA-Polymerase (#600260), Stratagene, Heidelberg

Alle Enzyme wurden in den vom Hersteller empfohlenen Standardpuffern verwendet. Eventuelle Änderungen oder Ergänzungen werden im Methodenteil aufgeführt.

2.2.4 Größenmarker und Standards

- 1Kb plus DNA-Marker, 100 BP - 12 KB GibcoBRL, Eggenstein
- Lambda DNA-Marker, 48,5 KB – 1 MB, New England Biolabs, Beverly, USA
- Rainbow ¹⁴C Broad Range Protein-Marker CFA756, Amersham Biosciences Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

2.2.5 Chemikalien

- 2-Propanol, Merck, Darmstadt
- β -Mercaptoethanol Merck, Darmstadt
- AmplifyTM, Amersham Biosciences Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
- Agarose MP, Boehringer Mannheim GmbH
- Agarose PFGE, USB, Cleveland, Ohio, USA
- Ammoniumpersulfat, Merck, Darmstadt
- Aminosäuremix (20), Sigma, Deisenhofen
- Aminosäuremix (19), Sigma, Deisenhofen
- ATP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen
- Creatinphosphat, Sigma, Deisenhofen

- Creatinphosphokinase, Sigma, Deisenhofen
- CTP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- DMSO, Sigma, Deisenhofen
- Dithiothreitol, Amersham Biosciences Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
- EDTA 0,5 M, USB, Cleveland, Ohio, USA
- Essigsäure, Merck, Darmstadt
- Ethanol, Merck, Darmstadt
- Glycerin (95%), Merck, Darmstadt
- GTP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- H₂O (18,2 MOhm), Millipore, Billerica, Mass.,USA
- KCl, Merck, Darmstadt
- KOAc, Merck, Darmstadt
- KOH, Merck, Darmstadt
- Methanol, Merck, Darmstadt
- Mg(OAc)₂, Merck, Darmstadt
- NaCl, Merck, Darmstadt
- NH₄OAc, Merck, Darmstadt
- Polyethylenglykol 6000, Sigma, Deisenhofen
- Phosphoenolpyruvat, Sigma, Deisenhofen
- Putrescin, Sigma, Deisenhofen
- Pyrovatkinase, Sigma, Deisenhofen
- PMSF, Sigma, Deisenhofen
- SDS 10%, GibcoBRL, Eggenstein
- Sarkosyl, Sigma, Deisenhofen
- Spermidin, Sigma, Deisenhofen
- TCA, Sigma, Deisenhofen
- TEA, Sigma, Deisenhofen
- TEAOAc, Sigma, Deisenhofen
- Tris HCl, Sigma, Deisenhofen
- Tris Base, Sigma, Deisenhofen
- TE-Puffer, Sigma, Deisenhofen
- TEMED, BioRad, , Hercules, CA, USA
- Ultima Gold XR LSC Coctail, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA
- UTP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- Xylencyanol-Blau, Sigma, Deisenhofen

2.2.6 Radiochemikalien

- L-(35S)-Methionin, 5 mCi (185 MBq), #NEG709A005MC, Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA
- Rainbow ¹⁴C Broad Range Protein-Marker CFA756, Amersham Biosciences Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

2.2.7 Nährmedien

Nährmedien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Bei antibiotikahaltigen Nährmedien wurden diese erst nach Abkühlung der Medien unter 40°C zugesetzt.

- BHI, Difco, Cleveland, USA
- FKS (Seromed, S0315 Lot #3344), Biochrom, Berlin
- ISO-Sensitest, Difco, Cleveland, USA
- LB, GibcoBRL, Eggenstein

Agarplatten wurden mit dem entsprechenden Medium plus 15 g Agar pro Liter Flüssigmedium hergestellt.

2.2.8 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde steriles Millipore H₂O (18,2 MOhm) verwendet.

2.2.8.1 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

1 x TBE-Puffer	Tris	100 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	1 mM
Agarosegel-Färbelösung	Ethidiumbromid	2,5 µM
Agarosegel-Entfärbelösung	Millipore H ₂ O	18,2 MOhm

Material

Blaumarker für Agarosegele	Ficoll	2,5 g
	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol	0,025 g
	EDTA, 0,5 mM	1 ml
	SDS, 10%	1 ml
	H ₂ O	ad 10 ml

2.2.8.2 Puffer und Lösungen für die SDS/PAGE Gelelektrophorese

Elektrodenpuffer (10x)	Tris pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1% (w/v)

SDS/PAGE Stock Solution I	Acrylamid	30%
	Bisacrylamid	0,8%

Trenngel 12%, 50 ml	SDS/PAGE Stock Solution I	20 ml
	Tris pH 8,8, 1,5 M	7,5 ml
	SDS, 10%	500 µl
	APS, 10%	150 µl
	TEMED	50 µl
	Millipore H ₂ O	ad 50 ml

SDS/PAGE Sammelgel, 10 ml	SDS/PAGE Stock Solution I	1,6 ml
	Tris pH 6,8, 0,5 M	2,5 ml
	SDS, 10%	100 µl
	APS, 10%	50 µl
	TEMED	20 µl
	Millipore H ₂ O	ad 10 ml

SDS/PAGE-Fixierlösung	2-Propanol	25%
	Essigsäure	15%

TCA-Probenpuffer	Tris pH 7,0	130 mM
	DDT	20 mM
	SDS	2%
	Glycerin	12%
	Bromphenolblau	0,01%

2.2.8.3 Puffer zum enzymatischen Zellaufschluß gram-positiver Organismen

Lysostaphin Puffer L1	EDTA pH 8,0	100 mM
	Tris pH 8,0	10 mM
	NaCl	100 mM
	Sarkosyl	1% (w/v)
	Proteinase K	100 µg/ml

2.2.8.4 Puffer zur Herstellung von S30-Extrakten aus *S. aureus*

S30-Puffer, pH 8,0	TEA	10 mM
	Mg(OAc) ₂	14 mM
	KCl	60 mM
	DTT	1 mM
AC-S30-Puffer, pH 8,0	TEA	10 mM
	Mg(OAc) ₂	14 mM
	KOAc	60 mM
	DTT	1 mM
Readout-Mix, 105,6 µl	TEA OAc pH 7,5, 1 mM	60,0 µl
	DTT, 1 mM	0,6 µl
	Mg (OAc) ₂ , 1 M	1,6 µl
	20-Aminosäuren-Mix, 1 mM	6,0 µl
	ATP, 0,25 M	2,0 µl
	Phosphoenolpyruvat, 0,2 M	27,0 µl
	Pyrovatkinase, 2 mg/ml	2,4 µl

Material

Kompensationspuffer, 10ml	TEAOAc pH 7,5, 1 M	1920 µl
	KOAc pH 7,5, 4 M	1660 µl
	Mg(OAc) ₂ , 1 M	315 µl
	NH ₄ OAc, 1 M	1000 µl
	Spermidin, 100 mM	400 µl
	H ₂ O	ad 10 ml
Reaktionsmix (R-Mix)	Kompensationspuffer	5 µl
	PEG 6000, 40% (w/v)	2 µl
	19-Aminosäurenmix, 1 mM	1 µl
	DTT, 200 mM	0,25 µl
	ATP, 250 mM	0,25 µl
	GTP, 50 mM	0,25 µl
	UTP, 50 mM	0,25 µl
	CTP, 50 mM	0,25 µl
	PEP, 200 mM	0,625 µl
	KOH, 1 M	0,25 µl
	Putrescin, 200 mM	1 µl
	Creatinphosphat, 500 mM	0,4 µl
	Creatinphosphokinase, 10 mg/ml	0,1 µl

2.2.8.5 Qiagen Puffer

Puffer B1	Tris pH 8,0	50 mM
	EDTA pH 8,0	50 mM
	Tween-20	0,5%
	Triton X-100	0,5%
Puffer B2	GuanidinHCl	3 M
	Tween-20	20%

Puffer QBT	NaCl	750 mM
	MOPS pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15%
	Triton X-100	0,15%
Puffer QC	NaCl	1 M
	MOPS pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15%
Puffer QF	NaCl	1,25 M
	Tris pH 8,5	50 mM
	Isopropanol	15%

2.2.9 Antibiotika

Folgende Antibiotika wurden für die experimentellen Arbeiten verwendet. Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der angefertigten Stocklösungen und das verwendete Lösungsmittel. Die Lagerung von TAN1057 erfolgte bei -80°C , alle anderen Antibiotikalösungen wurden bei -20°C gelagert.

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	100 mg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	25 mg/ml	70% EtOH
Ciprofloxacin	10 mg/ml	DMSO
Clindamycin	10 mg/ml	H ₂ O
Erythromycin	100 mg/ml	70% EtOH
Erythromycin	3,2 mg/ml	H ₂ O
Fosfomycin	10 mg/ml	H ₂ O
Fusidinsäure	10 mg/ml	H ₂ O
Imipenem	50 mg/ml	70% EtOH
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O
Linezolid	20 mg/ml	DMSO
Methicillin	10 mg/ml	H ₂ O
Moxifloxacin	20 mg/ml	DMSO
Neomycin	10 mg/ml	H ₂ O
Penicillin G	20 mg/ml	DMSO
Streptomycin	10 mg/ml	H ₂ O
TAN1057	100 mg/ml	DMSO
TAN1057	10 mg/ml	H ₂ O
Tetrazyklin	10 mg/ml	70% EtOH
Trimethoprim	10 mg/ml	DMSO
Vancomycin	4 mg/ml	H ₂ O

Tabelle 4: Konzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Antibiotika (Stocklösungen).

2.2.10 Bakterienstämme

Staphylococcus aureus 133, DSM11832

Staphylococcus aureus RN4220

Escherichia coli DH5 α

Escherichia coli HN818

2.2.11 Plasmide

pKV48 Das Plasmid pKV codiert ein Chloramphenicolacetyltransferase-Gen. Das Plasmid ist ein Derivat des lacZ-Reportervektors pEVP3 und enthält eine Promotorregion aus *S. pneumoniae* [57].

2.2.12 PCR-Primer

PCR-Primer wurden von den Firmen GibcoBRL und Invitrogen bezogen. Die Primer wurden entsalzt in einer Konzentration von 50 nmoles bestellt. Die gelieferten Primer wurden in reinem H₂O gelöst, zu einer 100 μ molaren Lösung verdünnt und bei –20°C gelagert.

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

Die Arbeit mit Bakterien erfolgte gemäß den Laborbestimmungen für humanpathogene Keime der Sicherheitsstufe S2.

3.1.1 Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur

Das für die Bakterienzucht verwendete Nährmedium wurde vor Gebrauch autoklaviert, mit Bakterien aus einer Einzelkolonie oder Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Bakterien wurden aus einer Flüssigkultur oder einer Agarplatte mit einer Impföse aufgenommen und im 3-Ösen Ausstrich auf Agarplatten ausgebracht. Die Platten wurden vor der Bewertung für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, auf Wachstum und Verunreinigungen kontrolliert. Die weitere Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Die Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen steriles Medium als Leerwert. Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte > 1 wurden mit sterilem Wachstumsmedium verdünnt, um die optische Dichte der Flüssigkultur im linearen Messbereich des Photometers zu bestimmen.

3.1.4 Keimzahlbestimmung von Bakterienkulturen

Zur Bestimmung der Anzahl von Bakterien in Flüssigkulturen wurde die optische Dichte der Kulturen photometrisch ermittelt. Bei optischen Dichten > 1 wurden die Proben mit sterilem Medium 1:10 vorverdünnt. Die Keimzahl der Verdünnten Kulturen wurde anschließend in einem Haemocytometer bestimmt. Die Zählkammer wurde dazu mit einem befeuchteten Deckglas versehen und vom Rand her mit der Probe befüllt. Nach Auszählung von 4 Großquadraten (mit je 16 Unterquadraten) wurde aus diesen der Mittelwert gebildet und auf eine Ganzzahl gerundet.

Die Zellzahl der Suspension wurde nach Herstellerangabe mittels folgender Formel bestimmt: $\text{Zellen / ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Vorverdünnung} \times 10^4$

3.1.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von antibakteriell wirksamen Substanzen

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika für einzelne Bakterienstämme wurde mit einer Einzelkolonie der zu testenden Keime eine Übernachtskultur in geeignetem Wachstumsmedium angeimpft. Wie in Kapitel 1.3.2 besprochen, ist die wachstumshemmende Konzentration von TAN1057 sehr stark vom verwendeten Testmedium abhängig. Reines FKS-Medium stellt die sensitivste Option zur *in vitro* Testung der minimalen Hemmkonzentration von TAN1057 dar. Die MHK-Testung aller anderen Antibiotika erfolgte in ISO-Sensitest Medium. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die dichtgewachsenen Übernachtskulturen wurden in ISO-Sensitest Medium auf eine optische Dichte von $OD_{578} = 0,5$ eingestellt.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika auf Bakterienkulturen erfolgte per Mikrodilutionsverfahren in 96-Loch Platten nach [44]:

Die Testsubstanzen wurden nach einer entsprechenden Vorverdünnung der Ausgangslösung seriell 1:2 im Testmedium verdünnt. Steriles Wachstumsmedium wurde 1:500 mit den vorverdünnten Testkulturen ($OD_{578} = 0,5$) angeimpft. Die resultierende Bakterienkonzentration von $OD_{578} = 0,001$ entspricht dabei einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen / ml. Pro Verdünnungsreihe eines Antibiotikums wurde eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum und eine Sterilkontrolle ohne Bakterien durchgeführt. Die Testplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die niedrigste Antibiotikumkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum erkennbar war, wurde als der MHK-Wert definiert.

3.1.6 Selektion antibiotikaresistenter Bakterienstämme

Die Selektion antibiotikaresistenter Bakterienstämme erfolgte durch das Kultivieren der Stämme in Flüssigkulturen mit ansteigender Antibiotikumkonzentration. Die Durchführung der Selektion erfolgte dabei analog zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Antibiotikums. Nach Inkubation der Flüssigkulturen für 24 Stunden bei 37°C wurde deren optische Dichte bestimmt. Die bei der jeweils höchsten Antibiotikumkonzentration noch gewachsene Flüssigkultur wurde als Ausgangskultur für die Folgekultivierung verwendet. Mittels eines 3-Ösen Ausstrichs wurden Keime der jeweiligen Ausgangskulturen für die Folgekultivierung auf Agarplatten mit der gleichen Konzentration des Antibiotikums wie in der Flüssigkultur

ausgebracht und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Ausstreichen einer Einzelkolonie auf Agarplatten mit der gleichen Konzentration des Antibiotikums und einer anschließenden Inkubation für 24 Stunden wurde zweimal wiederholt. Nach dieser Vereinzelnung wurden drei Bakterienkolonien nach Kontrolle der minimalen Hemmkonzentration des zur Selektion verwendeten Antibiotikums bei -80°C gelagert.

3.1.7 Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterienstämmen

Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterienstämmen erfolgte in Flüssigkulturen. Dazu wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde die optische Dichte der Vorkulturen gemessen und mit dem gleichen Medium auf eine optische Dichte von $OD_{578} = 0,1$ eingestellt.

Die auf 37°C vorgewärmten, sterilen Flüssigkulturen für die Messung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden mit der verdünnten Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte zum Beginn der Messung und danach in Abständen von 30 Minuten.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Bestimmung der Konzentration von DNA in Lösungen

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm in einer 1 ml Quarzküvette. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte durch Messung des Puffers, in der die DNA gelöst vorlag. Dieser Wert wurde als Nullwert eingestellt. Die DNA-Lösung wurde im gleichen Puffer verdünnt, die Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

Messwert bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x 50 = DNA-Konzentration (µg/ml)

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Größenaufftrennung von DNA-Fragmenten. DNA ist in einem neutralem pH-Bereich negativ geladen. Eine angelegte Gleichspannung mobilisiert daher die geladene DNA. Diese wandert – wie die negativ geladenen Elektronen – von der Anode zur Kathode der Elektrophoresekammer durch das Gel. Die Laufgeschwindigkeit der DNA hängt dabei von der Größe der DNA-Fragmente

ab. Die Dichte des Agarosegels ermöglicht es kleinen DNA-Fragmenten, bei konstanter Laufzeit eine weitere Laufstrecke zurück zu legen als größere DNA-Fragmente. Die Veränderung der angelegten Spannung und der Dichte des Agarosegels bestimmen dabei entscheidend das Laufverhalten und die erzielbare Auflösung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen.

3.2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Restriktionskartierung genomischer DNA aus *S. aureus*

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten eingesetzt, die aufgrund ihrer Größe durch die konventionelle Gelelektrophorese nicht ausreichend aufgetrennt werden können. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wird zur Analyse genomischer DNA oder extrem großer DNA-Fragmente eingesetzt und ermöglicht eine Auftrennung von Fragmenten bis zu 10 MB Größe [112-114]. Das Prinzip der Pulsfeld-Gelelektrophorese beruht auf einem elektrischen Feld, das gepulst in variablem Winkel zur gewünschten Laufrichtung des Gels angelegt wird. Die Winkeländerung der Laufrichtung erzwingt eine räumliche Umlagerung der DNA-Moleküle, die bei steigender Größe der DNA-Moleküle mehr Zeit benötigt. Daher können kleinere DNA-Fragmente die Bewegung in Richtung des neuen Feldes bereits fortsetzen, während die Umlagerung größerer Fragmente noch nicht abgeschlossen ist. Die Auftrennung großer DNA-Fragmente setzt intakte DNA ohne Doppelstrangbrüche voraus. Die normale Isolierung genomischer DNA kann diese Qualität der DNA nicht erzielen. Um einen besseren Schutz der genomischen DNA vor Strangbrüchen zu ermöglichen, wurde die Zellyse der Keime eingebettet in Agarose durchgeführt. Die bakterielle DNA ist durch den Aufschluss der Zellen in Agarose weitgehend vor Scherkräften geschützt, die sonst zu Doppelstrangbrüchen der genomischen DNA führen und die Restriktionsanalyse der DNA per Pulsfeld-Gelelektrophorese negativ beeinträchtigen könnte.

Die genomische DNA aus *S. aureus* Stämmen der TAN1057-Resistenzselektion SA133TA wurde mit der Restriktionsendonuklease SmaI enzymatisch gespalten und mittels der Pulsfeld-Gelelektrophorese verglichen. Dazu wurden Agarose-Blöcke mit einer Bakterienkonzentration von 1×10^{10} Zellen pro ml Agarose hergestellt:

Die Zellzahl der entsprechenden ÜN-Kulturen wurde mittels eines Haemocytometers bestimmt, und auf eine Konzentration von 1×10^{10} Zellen pro ml verdünnt. Ein Milliliter dieser Kultur wurde entnommen, in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß

überführt und in einer Eppendorf Centrifuge 4502 bei 14.000 rpm (rt) für 2 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das gewaschene Bakterienpellet in 500 µl Lysostaphin-Puffer L1 resuspendiert.

Nach Zugabe von 500 µl 2%iger Pulse Field Agarose in 0,5 x TBE (55°C) wurden die Proben mit einer Pipette gemischt und in 1 ml Kunststoffspritzen mit abgeschnittener Spitze eingegossen. Nach dem Aushärten der Agarose wurden mit einem Skalpell möglichst dünne Agarosescheiben geschnitten und in 200 µl Lysostaphin-Puffer L1 gegeben. Nach Zugabe von je 10 µl Lysostaphin (10 mg/ml) wurden die Agarosescheiben für 18 h bei 37°C zum enzymatischen Aufschluss der bakteriellen Zellwand inkubiert. Nach der Inkubation der eingebetteten Bakterien mit Lysostaphin wurde das Enzym durch Inkubation für 1 h bei 55°C deaktiviert.

Der Puffer wurde zweimal durch das Überführen der Agarosescheiben in je 1 ml frischen Tris-Puffer (pH 8,0) für je 1 h bei Raumtemperatur gewechselt. Die Agarosescheiben wurden in je 100 µl NEB Puffer 4 überführt und nach Zugabe von 10 Units des Restriktionsenzym Smal für 2 Stunden bei 25°C inkubiert.

Die Pulsfeld-Gelelektrophoresekammer wurde mit frischem 0,5 x TBE Puffer befüllt und bei einer Pumpleistung von 60 l/h auf 14°C vorgekühlt. Das Pulsfeld-Gel wurde mit 1% Pulse Field Agarose in 0,5 x TBE-Puffer hergestellt und bei Raumtemperatur aushärten gelassen.

Die Agarosescheiben wurden mit einer Skalpellklinge in die Geltaschen eingesetzt und mit flüssiger Agarose fixiert.

Das Gel wurde in die Pulsfeld-Gelelektrophoresekammer gegeben und der Lauf mit folgenden Geräteparametern gestartet: Spannung: 5,5 V/cm, Puls: 10 s – 60 s, Winkel: 120°. Der PFGE-Lauf wurde nach 18 Stunden beendet. Die DNA-Banden wurden nach einer Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht visualisiert.

3.2.4 Anfärben von DNA-Banden in Agarosegelen

Agarosegele wurden für 5 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und anschließend für 30 Minuten in H₂O (Millipore) entfärbt. Ethidiumbromid interkaliert während der Färbung mit der doppelsträngigen DNA. Durch Anregung mit UV-Licht emittiert das interkalierte Ethidiumbromid längerwelliges Licht im sichtbaren Frequenzbereich. Die DNA-Banden wurden mittels eines Polaroid Digitalkamera-Systems fotografiert. Die Bilder wurden in digitalisierter Form archiviert.

3.2.5 DNA-Präparation genomischer DNA durch enzymatischen Zellaufschluß

Die Isolation genomischer DNA für die PCR-Amplifikation wurde entsprechend dem „Qiagen Genomic DNA Protocol (Bacteria / Mini)“ durchgeführt. Entsprechend des generischen Protokolls wurden gram-negative Organismen enzymatisch durch einen Lysozymverdau aufgeschlossen. Für den Zellaufschluß gram-positiver Organismen wurde anstelle des Puffers B1 und Lysozym der Puffer L1 und Lysostaphin (10 µg/ml) verwendet. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Zellyse wurden die verbliebenen Zellfragmente und Proteine unter alkalischen Pufferbedingungen denaturiert und von der DNA abgetrennt. Die DNA wurde bei niedrigen Salzkonzentrationen an Anionenaustausch-Säulen gebunden. Nach dem Waschen der gebundenen DNA wurde diese mit einem Hochsalzpuffer eluiert, nach einer Isopropanolfällung getrocknet und in H₂O pH 8,0 resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Qualität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromid-Färbung überprüft.

3.2.6 Isolierung des Plasmids pKV48 aus *Escherichia coli* DH5α

Das Plasmid pKV48 wurde aus dem *E. coli* Stamm *Escherichia coli* DH5α isoliert. Das Plasmid pKV48 ist Träger des für die gekoppelte Transkription/Translation verwendeten CAT-Gens. Der *E. coli* Stamm DH5α mit dem Plasmid pKV48 wurde in LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Das Plasmid pKV48 wurde entsprechend des „Qiagen Plasmid Purification Handbook“ aufgereinigt. Die Bakterien wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen an eine Anionenaustausch-Säule gebunden.

Nach dem Waschen der Säule wurde die DNA eluiert, mit Isopropanol gefällt, getrocknet und in H₂O pH 8,0 resuspendiert. Die Menge an eluierter DNA wurde photometrisch bestimmt, die Qualität durch die Visualisierung auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.7 Gen-Amplifikation mittels der PCR-Methode

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit der PCR-Maschine PE 9700 durchgeführt. Die verwendeten Einwegmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Das Pipettieren der PCR-Reaktionen wurden auf Eis durchgeführt, die Zugabe der DNA-Polymerase erfolgte ebenfalls auf Eis. Die PCR-Maschine wurde nach Erreichen der Vorheiztemperatur von 95°C mit den Proben beladen.

Für alle durchgeführten DNA-Amplifikationen wurde das „Herculase enhanced DNA-Polymerase“ System der Firma Stratagene verwendet. Die Herculase DNA-Polymerase ist ein Gemisch aus Pfu-Polymerase und Taq-Polymerase, wodurch eine hohe Genauigkeit der DNA-Amplifikation bei gleichzeitig hoher Prozessivität gewährleistet wird. In Verbindung mit den auf die Polymerase abgestimmten Reaktionspuffern ermöglicht dieses System die Amplifikation von langen DNA-Fragmenten (bis 15 KB) mit hohem GC-Gehalt und hohem Anteil an Sekundärstrukturen.

3.2.8 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde das „High Pure PCR-Product Purification Kit“ von Roche verwendet. Die zu reinigenden PCR-Reaktionen wurden in einen Hochsalzpuffer überführt und an eine Glasfaser-Matrix gebunden. Die Glasfaser-Matrix bindet DNA ab einer Größe von ca. 100 BP. Die Säule wurde gewaschen, die aufgereinigte DNA mit H₂O pH 8,0 eluiert und bei -20°C gelagert. Eine Probe der eluierten DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert.

3.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

PCR-Fragmente, die nach dem Aufreinigen und anschließender Kontrolle auf einem Agarosegel Sekundärbanden aufwiesen, wurden mittels der Gelextraktion isoliert. Dazu wurde die zu reinigende DNA auf einem LMP-Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht mit einem Skalpell präzise aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die im Gel enthaltene DNA wurde nach dem „QiaQuick Gel Extraction Kit“ Protokoll zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen isoliert. Dazu wurde der Agaroseblock in Puffer QG aufgenommen und bei 50°C aufgeschmolzen. Nach Zugabe von Isopropanol wurde die DNA an eine Silicagel-Membran gebunden. Die DNA wurde durch Zugabe von Waschpuffer von Verunreinigungen und Gelresten gereinigt, in H₂O pH 8,0 eluiert und bei -20°C gelagert.

3.3 PCR-Primerdesign

Alle verwendeten PCR-Primer wurden mit dem Programm Clone Manager 5 anhand öffentlich zugänglicher Sequenzen genomischer DNA von *S. aureus* Mu50 und *E. coli* K12 entworfen. Folgende Kriterien wurden für die Primersuche festgelegt:

- Primerlänge: 20 BP \pm 2 BP
- GC-Gehalt: 40% - 60%
- Schmelztemperatur: 55°C - 80°C
- Dimere: < 7
- 3' Dimere: < 3
- Stabilität 5' vs. 3' : \geq 2,0 kcal

Die PCR-Primer ermöglichten die Amplifikation der kodierenden Regionen und den regulatorischen Sequenzen der jeweiligen Operons. Anhand der genomischen Sequenzen von *S. aureus* N315 und *S. aureus* MW2 wurde überprüft, ob die Primer auch bei diesen Bakterienstämmen eine Amplifikation der jeweiligen DNA-Bereiche ermöglichten.

3.3.1 PCR-Amplifikation der 23S-rRNA Operons aus *S. aureus*

Folgende Primer wurden für die Amplifikation der 23S-rRNA Operons aus *S. aureus* verwendet:

23S-rRNA	Vorwärts-Primer [5' -> 3']	Rückwärts-Primer [5' -> 3']	[BP]
rRNA02	CCTATGGATGGCATTGGACCAG	GCGGAACGTAAGTTCGACTACC	6127
rRNA06	GGAAGTAGCTCAGCTTGGTAGA	CATCGACGCTAAGGAGCTTAAC	5248
rRNA09	TCGACGCTAAGGAGCTTAAC	GCGACAAGCAGGCATAAGAA	6224
rRNA12	TAGCGGAACGTAAGTTCGAC	CAGCGAATGGTTGAGAACCT	6493
rRNA15	GCCATCAACATTGCGTGACTTC	CAGCTAACGCATTAAGCACTCC	5586

Tabelle 5: Primer-Sequenzen zur Amplifikation der 5 23S-rRNA Operons aus *S. aureus*.

Die PCR-Primer wurden anhand der genomischen Sequenz von *S. aureus* Mu50 entwickelt. Eine computergestützte PCR-Amplifikation mit den so entwickelten Primern verlief für alle drei *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 erfolgreich.

Die Amplifikation der 23S-rRNA Operons über die flankierende genomische DNA wurde nach folgenden Parametern durchgeführt:

Operon	Parameter	Melt.	10 Zyklen á			25 Zyklen á			Final.
rRNA02	Temp. [°C]	94	94	55	72	94	58	72	72
	Zeit [s]	180	45	40	480	40	35	840	1500
rRNA06	Temp. [°C]	94	94	55	72	94	58	72	72
	Zeit [s]	180	45	40	480	40	35	840	1500
rRNA09	Temp. [°C]	94	94	44	72	94	46	72	72
	Zeit [s]	180	45	45	480	40	35	840	1500
rRNA12	Temp. [°C]	94	94	44	72	94	46	72	72
	Zeit [s]	180	45	45	480	40	35	840	1500
rRNA15	Temp. [°C]	94	94	55	72	94	58	72	72
	Zeit [s]	180	45	40	480	40	35	840	1500

Tabelle 6: PCR-Parameter zur Amplifikation der rRNA-Operons aus *S. aureus*. Substanzkonzentrationen pro 50 µl PCR-Reaktion: 5 µl 10x Herculase Puffer, 2,5 U Herculase, 5 µl 30% DMSO, 200 µM dNTPs, 1 µM Primer, 200 ng Template. Abweichungen im PCR-Protokoll der Operons rRNA09 und rRNA12 von den Amplifikationsparametern der Operons rRNA02, rRNA06, rRNA012 und rRNA15 sind markiert.

3.3.2 Sequenzierung der 23S-rRNA Operons aus *S. aureus*

Die Sequenzierung der fünf amplifizierten 23S-rRNA Operons aus *S. aureus* SA133TA6a und SA133TA0 wurde von der Firma GATC in Doppelstrangqualität mittels des Primer-walking Verfahrens durchgeführt.

Die Sequenzierungen der Bereiche mit den im *S. aureus* Stamm SA133TA6a gefundenen Punktmutationen U392C und C2321U wurde für weitere *S. aureus* Stämme von der Firma Qiagen mit folgenden Primern durchgeführt:

Name	Sequenzier-Primer [5' -> 3']
23SF	CCGTTGGCACGACAACTGGT
23SB	CGGTGGATGCCTTGGCACTA

Tabelle 7: Primer zur Sequenzierung der 23S-rRNA im Bereich der in *S. aureus* SA133TA6a gefundenen Punktmutationen U392C und C2321U.

3.3.3 PCR-Amplifikation der Pseudouridinsynthase-Operons aus *S. aureus*

Folgende PCR-Primer wurden für die Amplifikation der entsprechenden Pseudouridinsynthase-Operons verwendet:

Ψ-Synthase	Vorwärts-Primer [5' -> 3']	Rückwärts-Primer [5' -> 3']	[BP]
TruA	TTCAGCATCGATAACATACC	TGTTAAGAGAACGAGCTACA	1227
TruB	GAATGCGATTACGTATTATG	TTGACGAATAGAAGTTGTAG	1719
RluB	CGTTCGACATACAGGTCATA	CAGCGTAGCCAACAGTTAAT	1024
SAV1008	GGATCACCACCTTGTATTAC	CTCTTGAACACGCTCTTT	1131
SAV1197	CAGGAGAAGTTGTTGACTTT	AGGCGCTTTGTCAATCTAT	1225
SAV1753	ACAGCGCCACCTATACTAA	CGTCTTGCGGACGAATTCTT	826
SAV1850	CATCAAATCGCTCCAATTC	TAGTTACAATGCGGTATTGC	1036

Tabelle 8: Primer-Sequenzen zur Amplifikation der 7 Pseudouridinsynthesen (Ψ) aus *S. aureus*.

Folgende PCR-Parameter wurden für die Amplifikation der entsprechenden Operons verwendet:

Operon	Parameter	Melt.	30 Zyklen á			Final.
TruA	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
TruB	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
RluB	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
SAV1008	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
SAV1197	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
SAV1753	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420
SAV1850	Temp. [°C]	94	94	50	72	72
	Zeit [s]	180	30	30	120	420

Tabelle 9: PCR-Parameter zur Amplifikation der 7 Pseudouridin-Synthesen von *S. aureus*. Substanzkonzentrationen pro 50 µl PCR Reaktion: 5 µl 10x Herculase Puffer, 2,5 U Herculase, 200 µM dNTPs, 1 µM Primer, 200 ng Template.

3.3.4 Sequenzierung der Pseudouridinsynthase-Operons aus *S. aureus*

Die Sequenzierung der Pseudouridinsynthase-Operons aus *S. aureus* wurde mit den beschriebenen PCR-Primern der entsprechenden Operons von der Firma Qiagen durchgeführt. Aufgrund der Größe des Pseudouridinsynthase-Operons *truB* wurden zusätzlich folgende Sequenzierprimer verwendet:

Operon	Sequenzier-Primer [5' -> 3']
TruB	ATTAGAACGCTAGCAACTGA
TruB	ACCAGACTCGATTTCGTGTTA

Tabelle 10: Zusätzliche Primer zur Sequenzierung des Pseudouridinsynthase-Operons *TruB* in *S. aureus*.

3.3.5 PCR-Amplifikation der L-Protein Operons aus *S. aureus*

Folgende PCR-Primer wurden für die Amplifikation der entsprechenden Operons verwendet:

Gen	Protein	Vorwärts-Primer [5' -> 3']	Rückwärts-Primer [5' -> 3']	BP
rplA	L1	CTGCTCTTAACTTGCATATAG	TCTTTCAGCCTGTAATTG	796
rplI	L9	AAGAGGCGATAGCACAATTA	CTATCCATGAATGGTTACAC	547
rplJ	L10	CTTGAACGTGATGATCTATG	AGATGAACCAGCTGAAGTTA	849
rplK	L11	CGTCACGAAATGTTAAGAGT	AGTTAAGAGCAGACAACAGAAG	645
rplL	L7/L12	GGTACTCTGAGCTAGACAATA	GAAGCTGACATGATGAAAG	467
rplM	L13	CCTGTGCCTCTATATTCAACTT	GCAGAAACGAACAACAGTTA	620
rplQ	L17	GGTACTCTGAGCTAGACAATA	GAAGCTGACATGATGAAAG	581
rplS	L19	CACTATGATCCGCTGCTA	TTCACGAGATGGGCAAGAC	685
rplU	L21	TGAAGCTCCAGCACAAC	GACCGAAACAACGTAGAGTG	517
rplV	L22	GATAATACCAACACGAAGTC	TAGGTGAGTTTGCTCCTACT	518
rplY	L25	GTTTCGTTTCGTGATTATACG	AAGCACAGTGCTTGTTAAAC	812
rpmA	L27	GCTCTTATGCAGTTGTACAT	TGCTTGTGTCTTTACACACT	498
rpmB	L28	TAAGAGGTTGAGCTCTTAGT	TCATGACGATTATCTATAGG	517
rpmE	L31	CAACATGGTATTGAGTCACT	AGATTTCTTCAAGCAGCTAC	559
rpmF	L32	GGATATTGTGCGAGGATATAG	ATCGTTGCATTTCGTATTACC	658
rpmG	L33	ATATTGCGTAGTTGAGCAG	CCCAGAATTACTTCGTA	515
rpmG (2)	L33 (2)	GTCACATTATCACCCACTTT	TTAACCTGACGATTGTGTAG	472
rpmH	L34	CATCACTCGCTTATTTATCG	CAGAGTCTGCATAATCTGGTAT	317
rpmJ	L36	GGATACCACGGTATGATGAA	CGCGGAAGAATTACTTATCG	465
rplB-W- D-C	L2-L23- L4-L3	AATGCTCATCGACGAAAG	CTTACCATCTGGTGTAGACATC	2627
rplE-X-N	L5-L24- L14	TTCACAACGAGTGATTTCAC	CAAGAAACTCGTCCTTTATC	1491
rplO- rpmD	L15-L30	AACTCAGTGGCACCTTGAGA	TCAACATGGTTCGTGCTACA	920
rplR-F	L18-L6	GTCTCCAACATACTAATAATG	CAACTTCTGAAGGTGTAATC	1174
rplT-rpmI	L20-L35	TTGACCTTCTGGTTTATTCT	GCGTCAAATGTTTATCATGT	924
rpmC- rplP	L29-L16	TGCTGATAAAGGACGAGTTT	GATCTATCGTGGAGAAGTTCTT	927

Tabelle 11: PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation sämtlicher L-Proteine aus *S. aureus*.

Folgende PCR-Parameter wurden für die Amplifikation der entsprechenden Operons verwendet:

Gen	Protein	Parameter	Melt.	30 Zyklen á			Final.
rplA	L1	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplI	L9	[°C]	94	94	50	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplJ	L10	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplK	L11	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplL	L7/L12	[°C]	94	94	50	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplM	L13	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplQ	L17	[°C]	94	94	52	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplS	L19	[°C]	94	94	52	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplU	L21	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplV	L22	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplY	L25	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmA	L27	[°C]	94	94	50	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmB	L28	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmE	L31	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmF	L32	[°C]	94	94	53	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmG	L33	[°C]	94	94	53	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmG(2)	L33(2)	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmH	L34	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmJ	L36	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplB-W-D-C	L2-L23-L4-L3	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	180	420
rplE-X-N	L5-L24-L14	[°C]	94	94	52	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	120	420
rplO-rpmD	L15-L30	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rplR-F	L18-L6	[°C]	94	94	52	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	120	420
rplT-rpmI	L20-L35	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420
rpmC-rplP	L29-L16	[°C]	94	94	48	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	60	420

Tabelle 12: PCR-Parameter zur Amplifikation aller ribosomalen L-Proteine aus *S. aureus*. Substanzkonzentrationen pro 50 µl PCR-Reaktion: 5 µl 10x Herculase Puffer, 2,5 U Herculase, 200 µM dNTPs, 1 µM Primer, 200 ng Template. Variationen der Annealing-Temperatur zur Amplifikation der L-Protein Operons sind markiert. Die Extensionszeiten richten sich nach der Größe der Amplifikate (eine Minute pro Kilobase DNA).

3.3.6 Sequenzierung der L-Protein Operons aus *S. aureus*

Die Sequenzierung der L-Protein Operons aus *S. aureus* wurde von der Firma Qiagen mit den beschriebenen PCR-Primern der entsprechenden Operons durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt die bei großen Operons zusätzlich verwendeten Sequenzierprimer:

Operon	Sequenzier-Primer [5' -> 3']
rpIR-F	TTACCTTCTTTACGGCGAACG
rpIR-F	TTACCTTCTTTACGGCGAACG
rpIE-X-N	GGGTCCAATAATTGTACATTAG
rpIE-X-N	ATCCTGAAGGTGGAATCTTA
rpIB-W-D-C	ACTACAGTTAAGCCATTCTC
rpIB-W-D-C	TGGCGGTGGTATCGTATTCG
rpIB-W-D-C	AACGTCAATACCGTGTTATC
rpIB-W-D-C	TTGCATTGATACCATCTTTG

Tabelle 13: Zusätzliche Primer zur Sequenzierung der L-Protein Operons rpIR-F, rpIE-X-N und rpIB-W-D-C in *S. aureus*.

3.3.7 PCR-Amplifikation und Sequenzierung des rpIB-Operons aus *E. coli*

Folgende PCR-Primer wurden für die Amplifikation und Sequenzierung des rpIB-Operons aus *E. coli* HN818 verwendet:

Gen	Protein	Vorwärts-Primer [5' -> 3']	Rückwärts-Primer [5' -> 3']	[BP]
rpIB	L2	GAACGTGCTGACGACCATTA	AAGAAGGCCAGAATCTGGAC	1070

Tabelle 14: PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation von rpIB aus *E. coli*.

Folgende PCR-Parameter wurden für die Amplifikation der entsprechenden Operons verwendet:

Gen	Protein	Parameter	Melt.	30 Zyklen á			Final.
rpIB	L2	Temp. [°C]	94	94	52	72	72
		Zeit [s]	180	30	30	120	420

Tabelle 15: PCR-Parameter zur Amplifikation aller ribosomalen L-Proteine aus *S. aureus*. Substanzkonzentrationen pro 50 µl PCR-Reaktion: 5 µl 10x Herculase Puffer, 2,5 U Herculase, 200 µM dNTPs, 1 µM Primer, 200 ng Template.

3.4 DNA-Sequenzierung und Datenanalyse

Die Sequenzierung der amplifizierten und aufgereinigten PCR-Produkte wurde von den Firmen Qiagen und GATC durchgeführt. Alle Sequenzierungen wurden mit PCR-Produkten aus genomischer DNA des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamms SA133TA6a durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden jeweils doppelsträngig durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem Programm Clone Manager 5 für die Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung verglichen. Bei Abweichungen in beiden Sequenzen wurden die entsprechenden ABI-Rohdaten der Sequenzierung mit dem Programm Chromas 1.45 kontrolliert und abgeglichen. Bei verbliebenen Unsicherheiten bezüglich der Sequenzdaten oder unzureichender Sequenzlänge bzw. Qualität wurde die Sequenzierung wiederholt. Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm Clone Manager 5 zu einer Gesamtsequenz zusammengesetzt und mit den entsprechenden Sequenzen der zum Vergleich verwendeten Bakterienstämme verglichen. Bei Sequenzunterschieden wurde die Sequenzierung für den TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0 wiederholt und erneut verglichen. Die Analyse der Sequenzen erfolgte sowohl für die entsprechenden kodierenden Regionen als auch deren regulatorischen Bereiche.

Wurden Mutationen in den kodierenden Regionen der Pseudouridinsynthasen und der ribosomalen L-Proteine gefunden, so wurde die kodierende Sequenz mit dem Programm Clone Manager 5 in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert. Führt eine DNA-Mutation zu einer veränderten Aminosäuresequenz, wurden die entsprechenden DNA-Bereiche aller *S. aureus* Stämme der Resistenzselektion SA133TA sequenziert, um das Auftreten der Mutation zeitlich eingrenzen zu können. Um zu überprüfen, ob die Mutation reproduzierbar während der TAN1057-Resistenzentwicklung auftrat, wurde die entsprechenden Operons weiterer TAN1057-resistenter Bakterienstämme sequenziert.

3.5 Phylogenetischer Vergleich von Proteinsequenzen

Der phylogenetische Vergleich der während der TAN1057-Resistenzentwicklung aufgetretenen Änderungen der Aminosäuresequenz mit den Sequenzen folgender Spezies wurde mit dem Programm Phylosopher 4.1 durchgeführt:

Abkürzung	Spezies	Gruppe [Untergruppe]
Aaeo	<i>Aquifex aeolicus</i>	Aquificales
Cpneu	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Chlamydiales
Cana	<i>Anabaena</i>	Cyanobacteria
Drad	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Deinococcales
Aful	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Euryarchaeota
Hbsp	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	Euryarchaeota
Mjan	<i>Methanococcus jannaschii</i>	Euryarchaeota
Paby	<i>Pyrococcus abyssi</i>	Euryarchaeota
Pfur	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Euryarchaeota
Phor	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Euryarchaeota
Mlep	<i>Mycobacterium leprae</i>	Firmicutes [Actinobacteria]
Mtub	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Firmicutes [Actinobacteria]
Bhal	<i>Bacillus Halodurans</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Bsub	<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Cace	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Linn	<i>Listeria innocua</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Llact	<i>Lactococcus lactis</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Mgen	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Mpneu	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Mpul	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Saur	<i>Staphylococcus aureus N315</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
SaurM	<i>Staphylococcus aureus Mu50</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
SaurW	<i>Staphylococcus aureus MW2</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Spneu	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Spyo	<i>Streptococcus Pyrogenes</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]
Uure	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Firmicutes [Bacillus/Clostridium]

Tabelle 16a: Abkürzungen der für die phylogenetischen Untersuchungen verwendeten Organismen.

Abkürzung	Spezies	Gruppe [Untergruppe]
Atum	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Proteobacteria [alpha]
Bmel	<i>Brucella melitensis</i>	Proteobacteria [alpha]
Rcon	<i>Rickettsia conorii</i>	Proteobacteria [alpha]
Nmen	<i>Neisseria meningitidis</i>	Proteobacteria [beta]
Ecoli	<i>Escherichia coli K12</i>	Proteobacteria [gamma]
EcoliJ	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Proteobacteria [gamma]
Hinf	<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteobacteria [gamma]
Pmul	<i>Pasteurella multocida</i>	Proteobacteria [gamma]
Styp	<i>Salmonella typhi</i>	Proteobacteria [gamma]
Vcho	<i>Vibrio cholerae</i>	Proteobacteria [gamma]
Ypes	<i>Yersinia pestis</i>	Proteobacteria [gamma]
Paer	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteobacteria [gamma]
Hpyl	<i>Helicobacter pylori</i>	Proteobacteria [delta/epsilon]
Bbur	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Spirochetales

Tabelle 16b: Abkürzungen der für die phylogenetischen Untersuchungen verwendeten Organismen (Fortsetzung).

3.6 Arbeiten mit Proteinen und Ribosomen

Zur Analyse der inhibitorischen Wirkung ribosomal wirksamer Antibiotika auf die Proteinbiosynthese wurden Zellextrakte aus *S. aureus* verwendet. Die Methode der gekoppelten Transkription/Translation zur Messung der Proteinsyntheserate wurde beispielsweise in [124] beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Puffersysteme wurden in [127] beschrieben.

3.6.1 Herstellung von S30-Extrakten

Zur Herstellung von S30-Extrakten aus *S. aureus* wurde LB-Medium hergestellt, autoklaviert, mit Glucose versetzt (0,2% w/v) und bei 37°C gelagert. Eine *S. aureus* Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Das glukosehaltige LB-Medium wurde 1: 250 mit der dichtgewachsenen *S. aureus* Übernachtskultur angeimpft und unter Kontrolle der optischen Dichte bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{578} = 0,7$ wurden die Zellen in einem JLA 10.5 Rotor á 500 ml (9.500 rpm, 10 min., 4°C) abzentrifugiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, die abzentrifugierten Bakterien in je 50 ml S30-Puffer resuspendiert und in 50 ml-Gefäßen in einem JA17 Rotor (12000 rpm, 7 min., 4°C) erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 x durchgeführt, die Zellsedimente gesammelt und gewogen. Pro Gramm Nasszellengewicht wurde 1 ml S30-Puffer zugegeben und die Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von PMSF (Endkonzentration 0,5 mM) wurde die Zellsuspension mittels French-Press aufgeschlossen (5 Durchgänge bei 15000 PSI). Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Bakterien wurden abzentrifugiert (30 min., 4°C). Der Überstand (das S30-Rohextrakt) wurde pro ml mit 105,6 µl „Readout-Mix“ versetzt und bei 32°C für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Extrakt auf 4°C abgekühlt. Durch Zentrifugationsdialyse in Centriprep 10 Dialyseröhrchen (3000 g, 4°C) erfolgte ein dreimaliger Puffertausch gegen AC-S30-Puffer. Der fertige S30-Extrakt wurde portioniert und bei -70°C gelagert. Eine Probe wurde zur Konzentrationsbestimmung der Extrakte verwendet. Gemessen wurde die Lichtabsorption der Extrakte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Die Absorption bei 260 nm Wellenlänge gibt die Ribosomenkonzentration an. 1 A_{260} entspricht ca. 24 pmol an Ribosomen. Das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} zeigt die Reinheit der Extrakte an. Aufgereinigte Ribosomen, welche in S30-Extrakten den Großteil der gelösten Bestandteile ausmachen, weisen ein A_{260} / A_{280} Verhältnis von ~ 1,90 auf.

3.6.2 Herstellung von 70S-Ribosomen und S150-Fraktionen

Durch Ultrazentrifugation eines S30-Extraktes lassen sich die Ribosomen als 70S-Fraktion von den anderen zellulären Bestandteilen abtrennen. Dazu wurden S30-Extrakte für 18h in einem Ti70 Rotor bei 4°C und 21000 rpm zentrifugiert. Der S150-Überstand wurde abgenommen, dreimal gegen AC-S30 Puffer dialysiert, portioniert und bei -80°C gelagert. Die sedimentierten Ribosomen wurden mit einem sterilem Spatel von darüber liegenden Verunreinigungen befreit und in einem möglichst geringen Volumen AC-S30 Puffer bei 4°C resuspendiert, portioniert und bei -80°C gelagert.

3.6.3 Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion

Während der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion wird ein plasmidkodiertes Gen in eine mRNA transkribiert und vom Ribosom in das fertige Protein translatiert. Durch den Einbau einer radioaktiv markierten Aminosäure während der Translation lassen sich anhand der Menge der synthetisierten, radioaktiv markierten Proteine Rückschlüsse auf die Syntheserate der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion ziehen. Zusätzlich ist es möglich, die inhibitorische Wirkung von Substanzen auf die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion zu ermitteln [124, 128]. Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion wurde mit S30-Extrakten oder S150/70S Fraktionen aus unterschiedlich TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen durchgeführt. Das in der Reaktion eingesetzte Plasmid pKV48 kodiert die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT). Als radioaktiv markierte Aminosäure wurde ³⁵S-Methionin verwendet. Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion wurde eingesetzt, um die *in vitro* Wirkung von TAN1057 auf Extrakte aus unterschiedlich TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen zu untersuchen. Alle Zellextrakte aus den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen wurden in Experimenten jeweils parallel zu Extrakten aus dem TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm *S. aureus* 133 analysiert. Die inhibitorische Wirkung der translationshemmenden Substanz Erythromycin wurde bei allen untersuchten Extrakten parallel zur Kontrolle untersucht.

Folgendes beispielhafte Protokoll zeigt die Durchführung der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion. Bis zur Inkubation der fertigen Proben erfolgen alle Arbeitsschritte bei 4°C. Die Tabelle zeigt die in der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion eingesetzten Komponenten und deren Volumina:

Komponenten	Menge [μ l]
R-Mix	11,6
S30-Extrakt	2
RNAse Inhibitor	0,5
³⁵ S-Methionin	1 [0,4 μ Ci]
pKV48	2 [1 μ g DNA]
H ₂ O	3,9
Substanz	4
total	25

Tabelle 17: T/T-Reaktion: Komponenten & Volumina

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte von TAN1057 und Erythromycin erfolgte mittels der Auswertung von je 12 Messpunkten:

1. Jede Testreihe der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktionen enthielt eine Negativkontrolle ohne S30-Extrakt zur Bestimmung der nach der Probenaufbereitung verbleibenden Hintergrundstrahlung.
2. Eine Positivkontrolle ohne reaktionshemmende Substanz wurde zur Berechnung der maximalen Proteinsyntheserate verwendet.
3. – 12. Die Testsubstanz wurde in 10 Stufen jeweils 1:2 verdünnt. Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde zu den zehn restlichen Transkriptions-/Translationsreaktionen jeweils eine Konzentration der Verdünnungsreihe zugegeben.

Die Reaktionsansätze wurden für 5 Sekunden geschüttelt (400 rpm). Die Inkubation der Reaktionen erfolgte für 1,5 h bei 32°C. Das Beenden der Reaktion erfolgte durch Zugabe von KOH oder TCA-Lösung.

3.6.3.1 Visualisierung von ³⁵S-markierten Proteinen mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese

SDS-PAGE Gele werden verwendet, um Proteine nach ihren Molekulargewichten aufzutrennen. Entlang einer angelegten Gleichspannung wandern kleine Proteine schneller als große Proteine. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Proteinmarkers mit definierten Molekulargewichten kann die Größe der zu analysierenden Proteine abgeschätzt werden. Die Stärke der Proteinbande korreliert mit der Proteinmenge. Proteingele bestehen aus Trenngel und einem darrüberliegenden Sammelgel. Nach dem Probenauftrag und Anlegen der Gleichspannung wandern die Proteine in das Sammelgel, und werden im darunter liegenden Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Zur Größenauftrennung von ³⁵S-markierten Proteinen wurden 12%ige Polyacrylamidgele verwendet. Vor dem Probenauftrag erfolgte ein Vorlauf des unbeladenen Gels in der Gelkammer bei 100 V für 4 Stunden.

Die zu analysierenden Proben wurden in 100 µl 5%iger TCA-Lösung aufgenommen, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 25 µl denaturierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Nach einer Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 95°C und anschließendem Abzentrifugieren (30 Sekunden, 15000 rpm) wurden 20 µl des Überstandes auf einem reduzierenden SDS/PAGE-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte bei 30 V für 18 Stunden. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel entnommen und 3 mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten in Amplify-Lösung wurde das Gel auf Filterpapier gelegt, mit gewässertem Cellophanpapier überdeckt und für 2 Stunden bei 80°C in einen Vakuum-Geltrockner gegeben. Die Autoradiographie der ³⁵S-markierten Proteine erfolgte auf BioMax MS Filmen in einer Röntgenkassette unter Verwendung einer BioMax TranScreen LE Verstärkerfolie.

3.6.3.2 Quantifizierung von ^{35}S -Methionin in Proteinen

Der Gehalt von ^{35}S -Methionin in Proteinen wurde in einem Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter quantifiziert. Dazu wurden 25 μl Proteinprobe durch Zugabe von 10 μl 0,5 M KOH denaturiert. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37°C wurden 25 μl der Probe wie folgt in einer MHVBN45 Filterplatte aufbereitet und die Radioaktivität quantifiziert:

Arbeitsschritt	Substanz	Menge	Zeit [min.]	Temperatur
1. Waschen	10 mM TrisHCl pH 7,5	200 μl	5	RT
2. Filtern				
3. Equilibrieren	5% TCA	200 μl		4°C
4. Probenauftrag	Assay-Proben	15 μl	30	4°C
5. Filtern				
6. Waschen 1	5% TCA	200 μl		4°C
7. Filtern				
8. Waschen 2	5% TCA	200 μl		4°C
9. Filtern				
10. Waschen 3	70% EtOH	200 μl		RT
11. Filtern				
12. Trocknen			30 - 60	RT / Rotlicht
13. Aufbereiten	Scint-Flüssigkeit	45 μl	30	RT

Tabelle 18: Aufbereiten von ^{35}S -Methionin-haltigen Proteinen zur Quantifizierung per Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter.

Die Quantifizierung der im Filter vorhandenen Menge an denaturiertem Protein mit inkorporiertem ^{35}S -Methionin erfolgte durch eine CCPM-Messung für 30 Sekunden pro Probe.

3.6.4 IC₅₀-Berechnung für TAN1057 und Erythromycin in der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion

Die Berechnung eines IC₅₀-Wertes dient der Ermittlung einer Substanzkonzentration, welche benötigt wird um 50% einer gegebenen Reaktion zu inhibieren. Die Proteinsyntheserate der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion wird durch die Messung der in die Proteine inkorporierte Menge an ³⁵S-Methionin in einem Scintillationszähler quantifiziert. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte dabei durch folgende Berechnungen:

- Die Negativkontrolle der jeweiligen Testreihen ohne Zellextrakte zeigte die Menge der unspezifisch an den Filter gebundenen Radioaktivität an und wurde folglich von allen Datenwerten subtrahiert.
- Die Positivkontrolle der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktionen enthielt kein Antibiotikum und wurde für ihre jeweilige Datenreihe als 100% der Syntheseleistung definiert.
- Die Syntheseleistungen der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktionen wurde für die restlichen Reaktionen in Abhängigkeit der zugegebenen in Prozent der Ausgangssynthese umgerechnet.
- Die Bestimmung des IC₅₀-Wertes für ein spezifisches Antibiotikum und bei einem gegebenen S30-Extrakt wurde mit dem Programm Prism 4 vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Selektion TAN1057-resistenter *S. aureus* 133 Stämme

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus von TAN1057 und des Resistenzmechanismus von *S. aureus* wurden in einem Zeitraum von sechs Tagen *S. aureus* Stämme in FKS-Medium und steigenden Konzentrationen an TAN1057 selektioniert. Die bei der höchsten Konzentration von TAN1057 dicht gewachsene *S. aureus* Kultur wurde zum Animpfen der jeweiligen Folgekulturen verwendet. Um die Homogenität der Isolate zu gewährleisten, wurden diese auf entsprechend TAN1057-haltigen FKS-Agarplatten ausgestrichen und nach dreimaligem Überimpfen jeweils einer Einzelkolonie isoliert. Der an Tag 6 isolierte Stamm wurde sechs mal auf FKS-Agarplatten ohne TAN1057 überimpft, Einzelkolonien isoliert und die minimale Hemmkonzentration von TAN1057 bestimmt und mit der des Vorgängerstammes verglichen:

Stamm	Isoliert [Tag]	MHK TAN1057 [$\mu\text{g/ml}$]	Steigerung pro Tag um Faktor	Steigerung zu Tag 0 um Faktor
SA133TA0	0	0,125		
SA133TA1	1	0,5	4	4
SA133TA2	2	1	2	8
SA133TA3	3	2	2	16
SA133TA4	4	8	4	64
SA133TA5	5	32	4	256
SA133TA6	6	> 64	> 2	> 512
SA133TA6a		> 64		> 512

Tabelle 19: Sechstägige Resistenzentwicklung von *S. aureus* 133 gegen TAN1057.

Die Resistenzentwicklung von *S. aureus* 133 gegen TAN1057 verlief in mehreren Stufen. Die minimale Hemmkonzentration von TAN1057 für den Ausgangsstamm der Resistenzentwicklung SA133TA0 lag in FKS-Medium bei 0,125 $\mu\text{g/ml}$. Sie erhöhte sich täglich um den Faktor zwei bis vier.

Innerhalb von 6 Tagen wurden *S. aureus* Stämme mit einer minimalen TAN1057 Hemmkonzentration von > 64 $\mu\text{g/ml}$ selektioniert, einem Anstieg um den Faktor > 512 im Vergleich zum Ausgangsstamm SA133TA0 (0,125 $\mu\text{g/ml}$).

Der durch sechsmaliges Überimpfen von SA133TA6 in reinem FKS-Medium selektionierte Stamm SA133TA6a zeigte auch eine minimale Hemmkonzentration von $>64 \mu\text{g/ml}$ TAN1057. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die intermediär TAN1057-resistenten Isolate SA133TA1 bis SA133TA5 nach mehrmaligem Überimpfen in TAN1057 freiem FKS-Medium keine feststellbaren Änderungen der TAN1057-Resistenz aufwiesen:

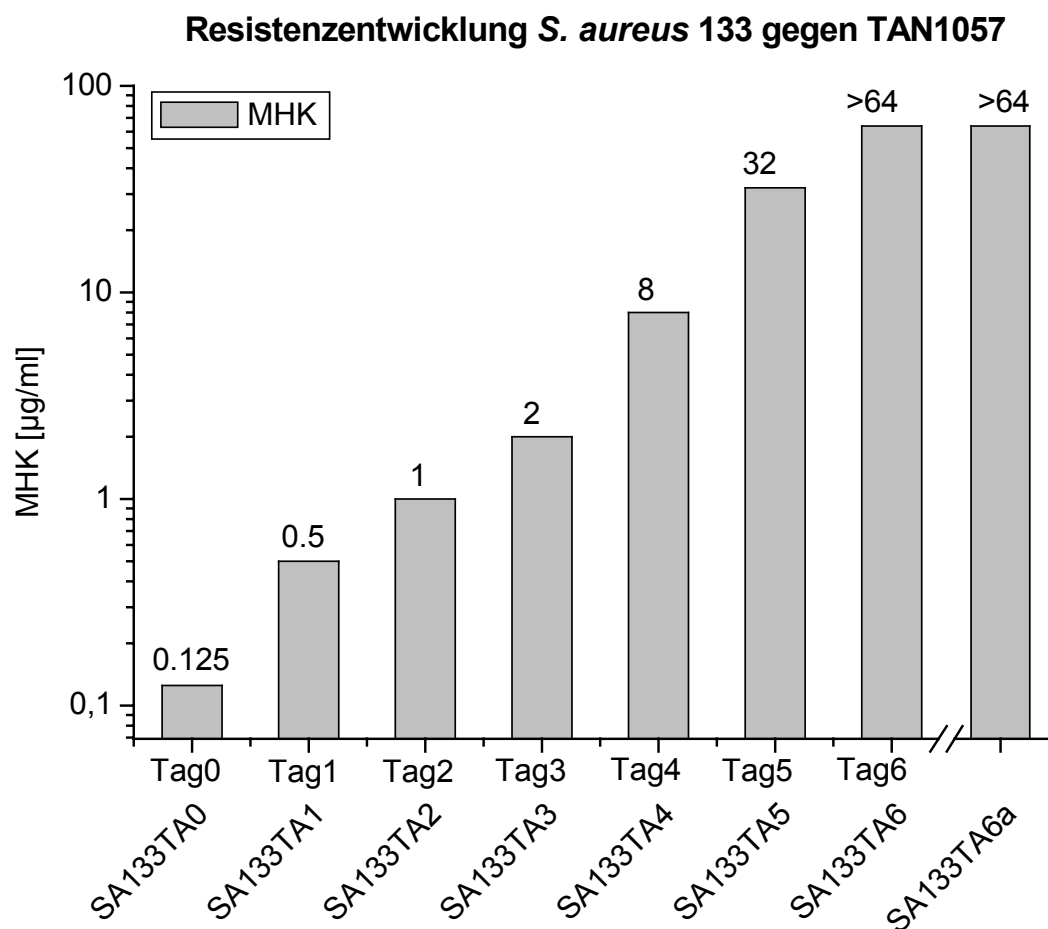


Abbildung 12: Minimale Hemmkonzentration der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme.

4.2 Kontrolle der Entwicklung TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme

Um sicherzustellen, dass die beobachtete mehrstufige Resistenzentwicklung von *S. aureus* 133 gegenüber TAN1057 einen typischen Resistenzverlauf darstellt, wurde die Resistenzentwicklung mehrfach wiederholt. Es wurden fünf Resistenzentwicklungen mit dem *S. aureus* Stamm 133 und drei mit dem *S. aureus* Stamm RN4220 durchgeführt.

Als Kontrolle diente eine Resistenzentwicklung gegen Chloramphenicol, Erythromycin und eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum. Die minimale Hemmkonzentration von TAN1057 gegenüber wildtypischen *E. coli* Stämmen ist allgemein zu hoch ($> 100 \mu\text{g/ml}$), um eine *in vitro* Resistenzentwicklung durchführen zu können [81]. Der *E. coli* Stamm HN818 zeigte in FKS-Medium gegenüber TAN1057 jedoch eine deutlich niedrigere Grundresistenz von $2 \mu\text{g/ml}$. *E. coli* HN818 ist eine AcrAB-Defektmutante [132], wodurch HN818 nicht in der Lage ist, den AcrAB-Transporter zu exprimieren. AcrAB ist ein Membranprotein, das für den Efflux verschiedener Antibiotika verantwortlich ist (MDR-Typ) [144]. Der *E. coli* Stamm ermöglichte es daher, die Resistenzentwicklung eines gram-negativen *E. coli* Stammes gegen TAN1057 zu untersuchen:

Resistenzreihe	Ausgangsstamm	Substanz
SA133TB	<i>S. aureus</i> 133	TAN1057
SA133TC	<i>S. aureus</i> 133	TAN1057
SA133TD	<i>S. aureus</i> 133	TAN1057
SA133TE	<i>S. aureus</i> 133	TAN1057
SA133TF	<i>S. aureus</i> 133	TAN1057
SA4220TA	<i>S. aureus</i> RN4220	TAN1057
SA4220TB	<i>S. aureus</i> RN4220	TAN1057
SA4220TC	<i>S. aureus</i> RN4220	TAN1057
SA4220CA	<i>S. aureus</i> RN4220	Chloramphenicol
SA4220EA	<i>S. aureus</i> RN4220	Erythromycin
SA4220	<i>S. aureus</i> RN4220	
HN818TA	<i>E. coli</i> HN818	TAN1057

Tabelle 20: Übersicht der durchgeführten Resistenzentwicklungen. (Nomenklatur der Resistenzreihe, Ausgangsstamm und Substanz)

Die Ergebnisse der zusätzlichen Resistenzentwicklungsreihen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Resistenz-Reihe	verwendete Substanz	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MHK [µg/ml]
SA133TA	TAN1057	0,125	0,5	1	2	8	32	>64
SA133TB	TAN1057	0,25	1	2	4	16	32	>64
SA133TC	TAN1057	0,25	1	2	4	8	32	64
SA133TD	TAN1057	0,25	0,5	1	2	8	32	>64
SA133TE	TAN1057	0,25	1	2	4	8	16	64
SA133TF	TAN1057	0,25	1	2	4	8	32	64
SA4220TA	TAN1057	0,064	0,25	1	2	4	16	32
SA4220TB	TAN1057	0,064	0,25	0,5	1	2	8	64
SA4220TC	TAN1057	0,064	0,25	0,5	1	4	16	32
SA4220CA	CAM	4	4	8	16	16	16	16
SA4220EA	ERY	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25
SA4220		0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
HN818TA	TAN1057	2	4	8	16	16	32	64

Tabelle 21: MHKs der durchgeführten Resistenzentwicklungen pro Tag.

Die fünf Resistenzentwicklungsreihen SA133TB bis SA133TF von *S. aureus* 133 gegen TAN1057 verliefen analog zur ursprünglichen Resistenzreihe SA133TA. Ein täglicher Anstieg der bakteriellen Resistenz um den Faktor 2 bis 4 konnte in allen Fällen beobachtet werden. Nach 6 Tagen lagen gegenüber TAN1057 hoch resistente *S. aureus* Stämme vor.

Die Kontrolle mit *S. aureus* RN4220 ergab ein ähnliches Bild. Die Ausgangsresistenz von *S. aureus* RN4220 gegen TAN1057 in FKS-Medium lag mit 0,064 leicht unterhalb der für *S. aureus* 133. Der Anstieg der bakteriellen Resistenz um ein bis zwei Stufen pro Tag war aber auch hier zu beobachten, so dass nach einer 6-tägigen Resistenzentwicklung *S. aureus* RN4220 Stämme vorlagen, die eine um den Faktor ≥ 512 erhöhte Resistenz gegen TAN1057 aufwiesen.

Die Resistenzentwicklung von *S. aureus* RN4220 gegen Erythromycin und Chloramphenicol zeigte einen deutlich unterschiedlichen Verlauf. Nach 6-tägiger Resistenzentwicklung gegen Erythromycin hatte sich die Resistenz nur um den Faktor 2 erhöht, die Resistenz von *S. aureus* RN4220 gegen Chloramphenicol erhöhte sich um den Faktor 4.

Wurde *S. aureus* RN4220 über 6 Tage hinweg in FKS-Medium ohne Antibiotikum inkubiert, änderte sich die Sensitivität gegenüber TAN1057 im Vergleich zum Ausgangsstamm SA4220 nicht.

Der Defekt des AcrAB Membrantransporters in *E. coli* HN818 machte es möglich, in diesem Stamm ebenfalls eine Resistenzentwicklung gegen TAN1057 durchzuführen. Der AcrAB Membrantransporter in *E. coli* ist für den Efflux verschiedener Antibiotika verantwortlich (MDR-Typ) [144]. Dies zeigt einerseits die grundsätzliche Sensitivität des gram-negativen *E. coli* Stammes HN818 gegenüber TAN1057, andererseits die prinzipielle Fähigkeit bakterieller Efflux-Pumpen, TAN1057 zu transportieren.

Die Resistenzentwicklung von *E. coli* HN818 gegen TAN1057 verlief ähnlich zu der in *S. aureus*. Es wurde wieder eine mehrstufige Resistenzentwicklung beobachtet. Die Resistenzentwicklung in *E. coli* HN818 verlief jedoch insgesamt langsamer als in den untersuchten *S. aureus* Stämmen. Die *in vitro* Resistenz von *E. coli* HN818 gegen TAN1057 stieg durchschnittlich um den Faktor 2 pro Tag.

4.3 Wachstumsgeschwindigkeit TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme

Die bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika aufgrund von chromosomalen Mutationen und plasmidkodierten Resistenzgenen ist meist mit einem verringerten Zellwachstum verbunden, welches ohne den Verlust der Antibiotikaresistenz durch kompensatorische Mutationen ausgeglichen werden kann [15, 16, 100, 129, 149, 176].

Die während der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA selektionierten *S. aureus* Stämme wurden daher unter Standardbedingungen auf Veränderungen in der Wachstumsdynamik kontrolliert. Als Wachstumsmedium wurde wie während der Resistenzentwicklung reines FKS-Medium verwendet.

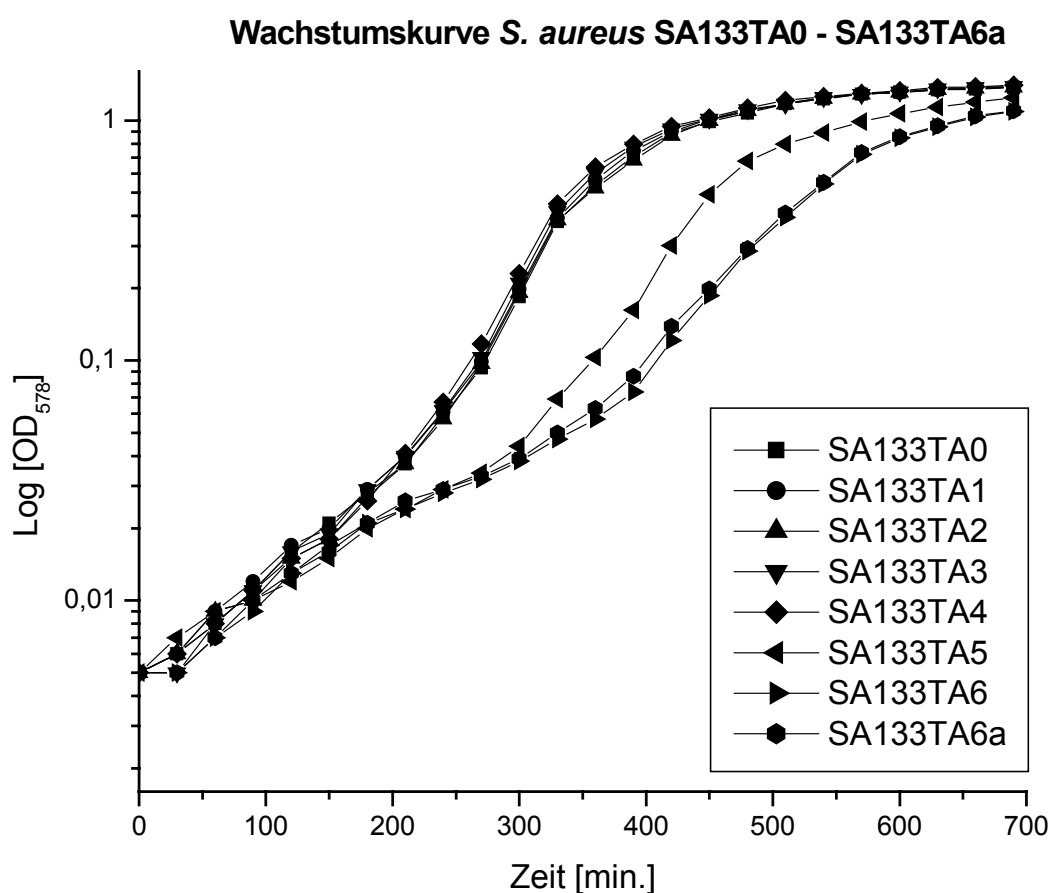


Abbildung 13: Wachstumsgeschwindigkeit *S. aureus* Isolate aus der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA0 bis SA133TA6a.

Die Abbildung verdeutlicht, dass sich das Wachstumsverhalten der *S. aureus* Stämme SA133TA1 (MHK = 0,125 µg/ml) bis SA133TA4 (MHK = 8 µg/ml) unter den gewählten Bedingungen nicht erkennbar von dem des Ausgangsstammes SA133TA0 unterschied:

- Die Resistenzentwicklung in TAN1057-haltigem FKS beeinflusste bis einschließlich Tag 4 nicht den Zeitpunkt, an dem die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreichten.
- Die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme SA133TA0 bis SA133TA4 blieb unter den gewählten Wachstumsbedingungen konstant.
- Die stationäre Phase wurde von allen vier Stämmen SA133TA0 bis SA133TA4 im gleichen Zeitraum erreicht.

Der an Tag 5 der Resistenzselektion isolierte *S. aureus* Stamm SA133TA5 (MHK = 32 µg/ml) zeigte einen deutlich verzögerten Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase, gefolgt von einer ebenso deutlich reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit.

Der Verlauf der Wachstumskurve der *S. aureus* Stämme SA133TA6 (MHK > 64 µg/ml) und SA133TA6a (MHK > 64 µg/ml) zeigt eine noch stärkere Verzögerung beim Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase in Verbindung mit einer weiteren Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem *S. aureus* Stamm SA133TA5.

Die Wachstumsdynamik der *S. aureus* Stämme SA133TA6 und SA133TA6a unterschied sich hingegen nicht wesentlich von einander. Dies zeigte, dass während der 6-tägigen Kultivierung des Stammes SA133TA6 ohne den Selektionsdruck von TAN1057 keine signifikante Änderung der Wachstumsdynamik erfolgte.

4.4 Kreuzresistenzen der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme gegen 19 Kontrollsubstanzen

Der Wirkort von TAN1057 ist das Ribosom [17, 20, 28, 67, 81]. Um zu überprüfen, ob sich während der TAN1057-Resistenzentwicklung die Wirkung anderer ribosomal wirksamer Antibiotika ebenfalls verändert hat, wurde die Wirkung verschiedener Translationshemmer mit dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a und dessen TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0 kontrolliert.

Zu den ribosomal wirksamen Antibiotika mit primärer Wirkung auf die 30S-Untereinheit gehören die Aminoglykoside und Tetrazyklin. Die Aminoglykoside binden mit hoher Affinität an den 30S-Initiationskomplex des Ribosoms, bestehend aus der 30S-Untereinheit, mRNA und tRNA, so dass keine weitere Zusammenlagerung mit der 50S-Untereinheit zum funktionellen Ribosom erfolgen kann. Darüber hinaus verlangsamen die Aminoglykoside die bereits initiierte Proteinsynthese funktioneller Ribosomen und induzieren Fehlablesungen der mRNA [12, 119, 146]. Als Vertreter dieser Gruppe von Antibiotika wurden Kanamycin, Neomycin und Streptomycin verwendet. Tetrazyklin bindet an die 30S-Untereinheit des Ribosoms und verhindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptor-Region des 70S-Ribosoms [77, 146, 177].

Zu den Substanzklassen, die an der 50S-Untereinheit des Ribosoms wirken, gehören Chloramphenicol und das zu den Lincosamiden gehörende Clindamycin [146].

Sie binden an die große ribosomale Untereinheit des Ribosoms und inhibieren die Peptidyltransferase-Aktivität des Ribosoms. Die Makrolide inhibieren die ribosomale Translokation [22, 26, 41, 116] und werden durch Erythromycin vertreten.

Darüber hinaus wurde nach Kreuzresistenzen gegenüber Antibiotika gesucht, die keinen ribosomalen Wirkmechanismus aufweisen:

- Fusidinsäure bindet an den Elongationsfaktor G (EF-G) und inhibiert die Freisetzung von EF-G aus dem EF-G/GDP Komplex [78, 121].
- Die Chinolone inhibieren primär die Wirkung der DNA-Gyrase. Diese ist während der DNA-Replikation für die nötigen strukturellen Änderungen der DNA-Konformation verantwortlich [71]. Die Substanzen Ciprofloxacin und Moxifloxacin sind Vertreter dieser Wirkstoffklasse.
- Ethidiumbromid ist kein Antibiotikum, jedoch wie die Fluorochinolone ein Substrat für Efflux-Pumpen des NorA-Typs. Eine Modifikation oder vermehrte Produktion dieser Efflux-Pumpen kann von Bakterien verwendet werden, um toxische Substanzen wie Antibiotika vermehrt auszuschleusen und die Konzentration dieser toxischen Substanz innerhalb der Bakterienzelle [90, 102, 108] abzusenken. Ein Anstieg der TAN1057-Resistenz wäre dann zu beobachten, obwohl keine Modifikation des Wirkortes vorliegt.
- Die Inhibitoren der Zellwandsynthese sind durch die Substanzen Ampicillin, Fosfomycin, Methicillin, Penicillin G [119, 169, 175] und Vancomycin [165, 175] vertreten.

- Die Kreuzresistenzuntersuchung gegen Inhibitoren der bakteriellen Folsäuresynthese wurde mit Trimethoprim [158] durchgeführt.

Der TAN1057-resistente *S. aureus* Stamm SA133TA6a und der sensitive Ausgangsstamm SA133TA0 wurden dazu auf Unterschiede in der Resistenz gegenüber 19 verschiedenen Substanzen untersucht. Die minimale Hemmkonzentration antibakteriell wirksamer Substanzen wurde in ISO-Sensitest Medium ermittelt, die Kontrolle der minimale Hemmkonzentration von TAN1057 erfolgte in FKS-Medium:

Keim	SA133TA0	SA133TA6a	Primärer Wirkort
Substanz	MHK [$\mu\text{g/ml}$]	MHK [$\mu\text{g/ml}$]	
TAN1057	0,1	>64	Ribosom, 50S
Chloramphenicol	8	4	Ribosom, 50S
Clindamycin	0,03	0,03	Ribosom, 50S
Erythromycin	0,125	0,25	Ribosom, 50S
Linezolid	4	2	Ribosom, 50S
Kanamycin	2	1	Ribosom, 30S
Neomycin	0,5	0,25	Ribosom, 30S
Streptomycin	8	4	Ribosom, 30S
Tetrazyklin	4	4	Ribosom, 30S
Fusidinsäure	1	1	EF-G
Ampicillin	0,25	0,25	Zellwand
Fosfomycin	8	8	Zellwand
Methicillin	2	4	Zellwand
Penicillin G	0,015	0,03	Zellwand
Teicoplanin	1	1	Zellwand
Vancomycin	1	1	Zellwand
Ciprofloxacin	1	0,25	DNA-Gyrase
Moxifloxacin	0,03	0,03	DNA-Gyrase
Trimethoprim	2	2	Folsäure-Synthese
Ethidiumbromid	8	8	DNA*

Tabelle 22: Minimale Hemmkonzentration von 19 Kontrollsubstanzen gegen *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a. *:Die bakterielle Resistenz gegenüber EtBr wird durch Substanz-Efflux vermittelt.

Die minimalen Hemmkonzentrationen der 19 getesteten Substanzen unterschieden sich für den TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stamm SA133TA0 und den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a nur geringfügig. Schwankungen der ermittelten Werte um \pm eine Resistenzstufe lagen innerhalb der Messgenauigkeit der Experimente. Eine Kreuzresistenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber den getesteten Substanzen konnte nicht festgestellt werden.

4.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese genomischer DNA aus *S. aureus*

Die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde verwendet, um mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I gesplattene, genomische DNA der *S. aureus* Stämme SA133TA0 – SA133TA6a miteinander zu vergleichen:

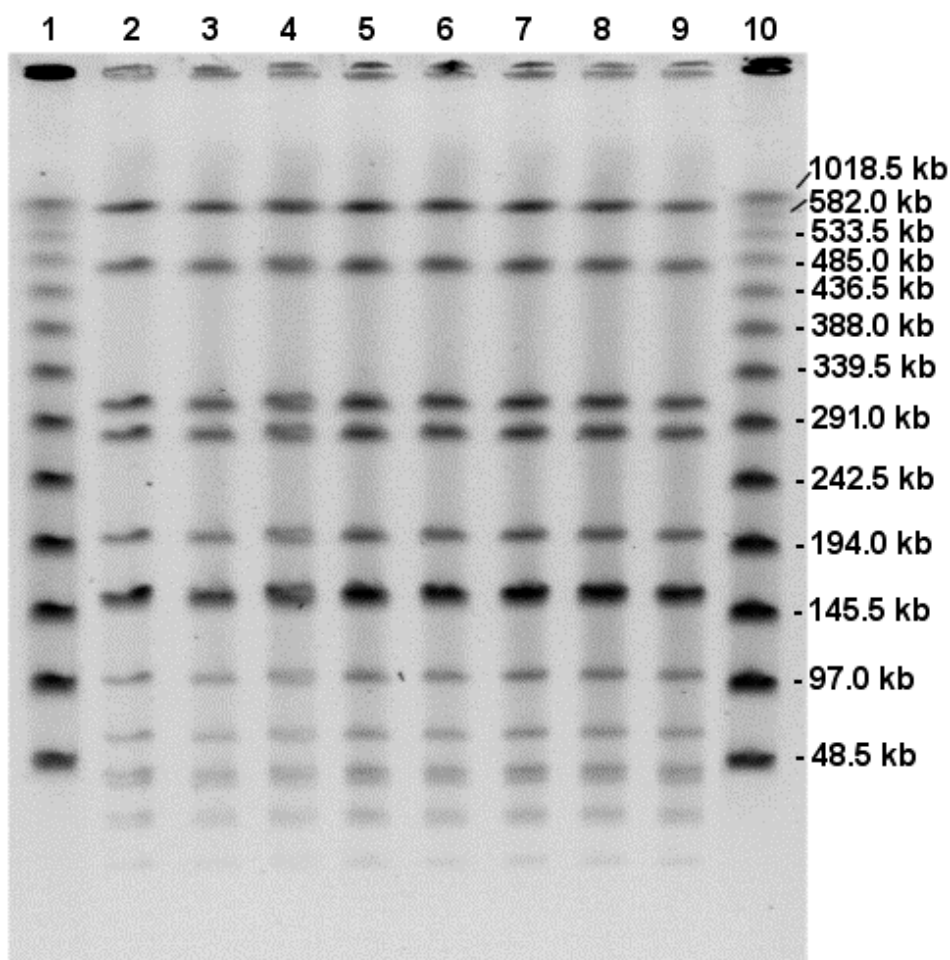


Abbildung 14: Restriktionsmuster *Sma*I geschnittener genomischer *S. aureus* DNA. Slot 1 & 10: λ -Leiter, Slot 2 – 9: genomische DNA aus SA133TA0 bis SA133TA6a nach Restriktionsverdau mit *Sma*I. Gelparameter: Temperatur: 12°C, Pumpleistung 60 l/h, Spannung 5,5 V/cm, Puls 10s – 60 s, Winkel 120°C, Lauf 18 h.

Das Gel zeigt die Smal-gespaltene, genomische DNA der *S. aureus* Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a. Während der TAN1057-Resistenzentwicklung konnten mit dieser Methode keine nachweisbare Veränderungen der genomischen DNA von *S. aureus* beobachtet werden.

Das Smal-Restriktionsmuster der Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a war im analysierten Trennbereich von 1018,5 Kilobasen bis unter 48,5 Kilobasen identisch. Größere Umlagerungen, Deletionen oder Insertionen genomischer DNA waren nicht zu beobachten. Eine Mutagenese durch Mobilisierung eines Transposons konnte nicht nachgewiesen werden. Das Gel zeigt auch, dass während der Resistenzentwicklungsreihe keine Verunreinigung durch andere Keime aufgetreten waren. Dies wäre durch differierende Bandenmuster zu erkennen gewesen.

4.6 Gekoppelte In vitro Transkription-/Translation zur IC₅₀ Bestimmung von TAN1057 in S30-Zellextrakten aus *Staphylococcus aureus*

Mittels der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation (T/T) wurde analysiert, ob die steigende TAN1057-Resistenz der *S. aureus* Stämme SA133TA0 - SA133TA6a auf Veränderungen des Ribosoms zurückzuführen ist. Dazu wurden aus allen 7 *S. aureus* Stämmen der Resistenzreihe SA133TA S30-Extrakte zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber TAN1057 in gekoppelten *in vitro* T/T-Experimenten hergestellt. In den T/T-Experimenten erfolgte die kombinierte Transkription und Translation des auf dem Plasmid pKV48 codierten Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Gens. Mittels der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion wurde die Konzentration von TAN1057 oder Erythromycin ermittelt, welche benötigt wird, um die in der T/T-Reaktion stattfindende Proteinsynthese um 50% zu inhibieren.

Zur Gewinnung aktiver S30-Extrakte aus *S. aureus* Zellen war eine Optimierung vieler Parameter notwendig:

- Durch beschriebene enzymatische Methoden zum Zellaufschluß von *S. aureus* Stämmen [127] konnten keine S30-Extrakte mit ausreichender Aktivität generiert werden. Daher wurde der Zellaufschluß mittels einer „French Press“ Druckzelle durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird eine Zellsuspension unter hohem Druck durch eine kleine Auslassöffnung gepresst. Der plötzliche Druckabfall innerhalb des Auslassventils führt zu einem Aufbrechen der Bakterienzellen. Der

Ausgangsdruck der „French Press“-Zelle und die Zahl der Passagen der Zellsuspension wurden so optimiert, dass aktive S30-Zellextrakte aus allen zu untersuchenden *S. aureus* Stämmen gewonnen werden konnten.

- Die Konzentration der gewonnenen S30-Extrakte wurde photometrisch bestimmt und für alle Extrakte auf eine Konzentration von 1 A_{260} /ml eingestellt.
- Durch Titrationsexperimente wurde die Konzentration der eingesetzten Menge an S30-Extrakten und Plasmid optimiert.
- Dauer und Temperatur der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion wurden in Vortests optimiert, um sicherzustellen, dass die Proteinsynthese nicht vor Abbruch der Reaktion beendet ist.
- Die Aktivität aller S30-Extrakte wurde in Vortests gemessen, indem die Gesamtsyntheserate der Extrakte sowie die Hemmwirkung von Erythromycin in der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation quantifiziert wurde.

Die optimierten Protokolle zur Gewinnung aktiver S30-Extrakte aus *S. aureus* und zur Durchführung der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion werden in Kapitel 3.6.1 bis Kapitel 3.6.3 beschrieben.

4.6.1 Gelelektrophoretische Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Erythromycin

Das T/T-Experiment wurde unter den in Kapitel 3.6.3 beschriebenen, optimierten Bedingungen durchgeführt. Nach der Beendigung der Reaktion wurden der Reaktionsansatz auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm visualisiert:

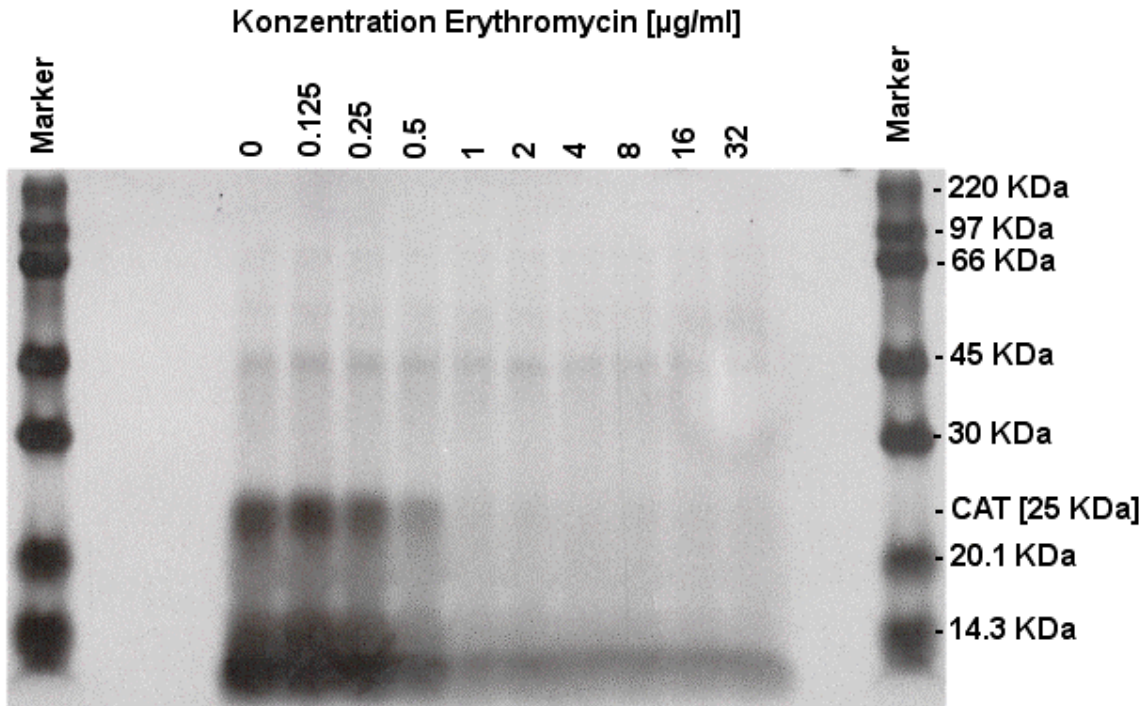


Abbildung 15: IC₅₀-Bestimmung von Erythromycin auf S30-Extrakt aus SA133TA0. Gel: 12% Polyacrylamid, denaturierend, Laufparameter: 30 V, 18 h. Belichtungszeit: 48 h.

Die Autoradiographie des PAA-Gel visualisiert die Hemmwirkung von Erythromycin auf die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion mit einem S30-Extrakt aus dem *S. aureus* Stamm SA133TA0. Das CAT-Protein besitzt eine Größe von ca. 25 KDa. In der Positivkontrolle ohne Erythromycin war eine Bande entsprechender Größe klar zu erkennen. Zusätzlich fiel eine starke niedermolekulare Sekundärbande, sowie eine schwächere hochmolekulare Nebenbande mit einer Größe von 45 KDa auf.

Mit steigender Konzentration von Erythromycin sank die Menge der synthetisierten Proteine. Sowohl die Stärke der 25 KDa-Bande des CAT-Proteins, als der Nebenbanden wurden deutlich schwächer. Der IC₅₀-Wert für Erythromycin lag im Bereich von 0,25 µg/ml bis 0,5 µg/ml.

4.6.2 Gelelektrophoretische Bestimmung des IC₅₀-Wertes von TAN1057

Zum Vergleich wurde die Hemmung von TAN1057 auf die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion des S30-Extraktes aus *S. aureus* SA133TA0 untersucht.

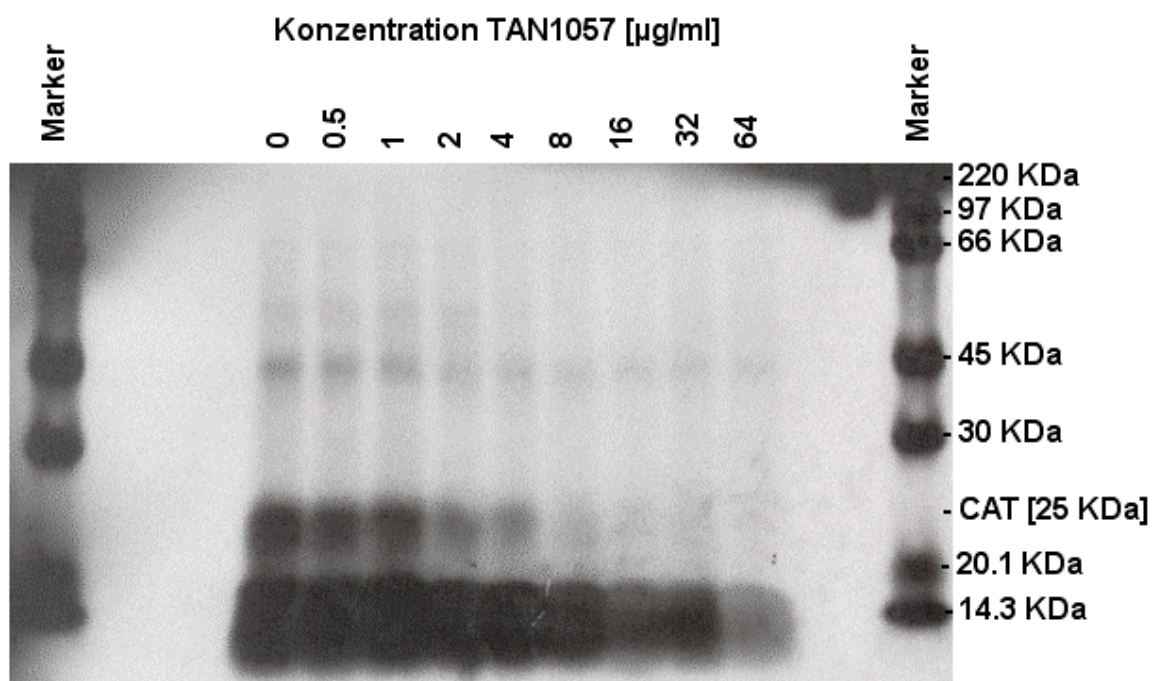


Abbildung 16: IC₅₀-Bestimmung von TAN1057 auf S30-Extrakt aus SA133TA0. Gel: 12% Polyacrylamid, denaturierend, Laufparameter: 30 V, 18 h. Belichtungszeit: 48 h.

Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion mit einem S30-Extrakt aus dem *S. aureus* Stamm SA133TA0 zeigte erneut eine CAT-Proteinbande bei 25 KDa. Auch die starke niedermolekulare Sekundärbande sowie die hochmolekulare 45 KDa Nebenbande waren zu erkennen. Der IC₅₀-Wert für TAN1057 wurde mittels der 25 KDa CAT-Bande ermittelt und lag im Bereich von 1 µg/ml bis 2 µg/ml.

4.6.3 TCA-Fällung und Quantifizierung ³⁵S-markierter Proteine

Das beschriebene Verfahren der Auftrennung synthetisierter Proteinbanden auf einem denaturierenden PAA-Gel und anschließender Autoradiographie war extrem zeitaufwendig und erzeugte darüber hinaus nur sehr wenige Datenpunkte, die kaum zu quantifizieren waren.

Um eine quantitative Auswertung der während der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion synthetisierten Proteinmenge bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen und damit eine Berechnung des IC₅₀-Wertes zu ermöglichen, wurde ein schnelleres und einfacheres System etabliert, in dem die ³⁵S-

markierten, synthetisierten Proteine nach Denaturieren, Filtern und Waschen in einem Scintillationszähler quantifiziert werden konnten.

Um sicherstellen zu können, dass die mittels Autoradiographie ermittelten IC_{50} -Werte mit denen der Scintillationszählung in Einklang stehen, wurden Proteinproben der in Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 visualisierten Transkriptions-/Translationsreaktion wie in Kapitel 3.6.3.2 beschrieben aufbereitet und quantifiziert:

S30-Extrakt	IC_{50} ERY [$\mu\text{g/ml}$] Gel	IC_{50} ERY [$\mu\text{g/ml}$] Counter	IC_{50} TAN1057 [$\mu\text{g/ml}$] Gel	IC_{50} TAN1057 [$\mu\text{g/ml}$] Counter
SA133TA0	0,25 – 0,5	0,4	1 - 2	1,3

Tabelle 23: Vergleich der IC_{50} -Bestimmung mittels Autoradiographie und Scintillationszähler

Der Vergleich der mit beiden Methoden ermittelten IC_{50} -Werte verdeutlicht, dass durch die Quantifizierung ^{35}S -markierter Proteine mittels TCA-Fällung und Scintillationszählung vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Aufgrund der beschriebenen Vorteile der Scintillationszählung wurde diese Methode zur Auswertung aller weiteren Experimente verwendet.

4.6.4 Bestimmung der IC_{50} -Werte von TAN1057 und Erythromycin in S30-Extrakten der *S. aureus* Resistenzreihe SA133TA

Während der Resistenzselektion gegenüber TAN1057 wurde ein mehrstufiger Resistenzanstieg beobachtet. Mittels der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion wurde daher untersucht, ob sich diese Beobachtung auch in einer Erhöhung der ribosomalen Resistenz widerspiegelt. Mittels der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion wurde die inhibitorische Wirkung von TAN1057 und Erythromycin auf die Proteinsynthese durch Scintillationszählung der ^{35}S -markierten Proteine quantifiziert. Der IC_{50} -Wert für TAN1057 wurde für S30-Extrakte der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a bestimmt. Die IC_{50} -Werte von TAN1057 wurden mehrfach in unabhängig durchgeführten Experimenten bestimmt, jeweils für einen S30-Extrakt aus dem TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm der Resistenzreihe, SA133TA0 und einen weiteren S30-Extrakt eines anderen Stammes dieser Resistenzreihe. Zudem wurde in jedem Experiment der IC_{50} -Wert für Erythromycin ermittelt:

#	S30-Extrakt	IC ₅₀ ERY [µg/ml]	IC ₅₀ TAN1057 [µg/ml]	S30-Extrakt	IC ₅₀ ERY [µg/ml]	IC ₅₀ TAN1057 [µg/ml]
1-1	SA133TA0	0,2	1,3	SA133TA1	0,2	1,4
1-2	SA133TA0	0,2	1,5	SA133TA1	0,2	1,4
2-1	SA133TA0	0,2	1,3	SA133TA2	0,2	1,4
2-2	SA133TA0	0,4	1,6	SA133TA2	0,4	1,4
3-1	SA133TA0	0,3	1,4	SA133TA3	0,3	1,3
3-2	SA133TA0	0,3	1,1	SA133TA3	0,4	1,3
4-1	SA133TA0	0,2	2,3	SA133TA4	0,3	2,0
4-2	SA133TA0	0,3	1,5	SA133TA4	0,5	1,8
4-3	SA133TA0	0,4	1,7	SA133TA4	0,4	1,5
5-1	SA133TA0	0,4	1,6	SA133TA5	0,4	23,3
5-2	SA133TA0	0,4	1,3	SA133TA5	0,4	29,2
6-1	SA133TA0	0,3	1,0	SA133TA6	0,2	17,5
6-2	SA133TA0	0,3	1,2	SA133TA6	0,2	13,3
7-1	SA133TA0	0,3	1,6	SA133TA6a	0,4	19,3

Tabelle 24: Zusammenfassung der IC₅₀-Werte von Erythromycin und TAN1057 auf S30-Extrakte aus SA133TA0-SA133TA6a.

Die statistische Analyse der Daten zeigte, dass sich der IC₅₀-Wert für TAN1057 in den S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA1 bis SA133TA4 gegenüber SA133TA0 nicht signifikant unterschied. In den S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA5 bis SA133TA6a konnte hingegen deutlicher Anstieg der Resistenz gegenüber TAN1057 beobachtet werden:

S30-Extrakt	MW [µg/ml]	SD
SA133TA0	1,5	0,3
SA133TA1-4	1,5	0,3
SA133TA5-6a	20,5	6,0

Tabelle 25: Statistische Analyse der IC₅₀-Werte von TAN1057 auf S30-Extrakte aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a.

Die IC_{50} -Werte von TAN1057 gegenüber S30-Extrakten aus den Stämmen SA133TA1 bis SA133TA4 entsprachen mit $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ TAN1057 weitgehend denen des wildtypischen *S. aureus* Stamms SA133TA0 mit $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ TAN1057. Bis einschließlich Tag 4 der TAN1057-Resistenzselektion von *S. aureus* konnte trotz des Anstieges der bakteriellen TAN1057-Resistenz um den Faktor 32 mit der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion kein Anstieg der TAN1057-Resistenz auf Translationsebene beobachtet werden.

Die Extrakte SA133TA5 bis SA133TA6a zeigten hingegen einen starken Anstieg der IC_{50} -Werte. Der sprunghafte Anstieg der IC_{50} -Werte von TAN1057 in S30-Extrakten aus dem *S. aureus* Stamm SA133TA5 auf das 13,7-fache des Ausgangswertes zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt der Resistenzentwicklung (Tag 5) eine Veränderung im Transkriptions-Translationsapparat eingesetzt hatte. Der erhöhte IC_{50} -Wert war auch in den S30-Extrakten der Folgestämme zu beobachten, stieg jedoch nicht weiter an. Trotz des stetigen, mehrstufigen Anstiegs der TAN1057-Resistenz während der sechstägigen Resistenzselektion konnte auf ribosomaler Ebene nur ein einstufiger Anstieg der Resistenz beobachtet werden:

Hemmung der Proteinsynthese in S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA0 - SA133TA6a

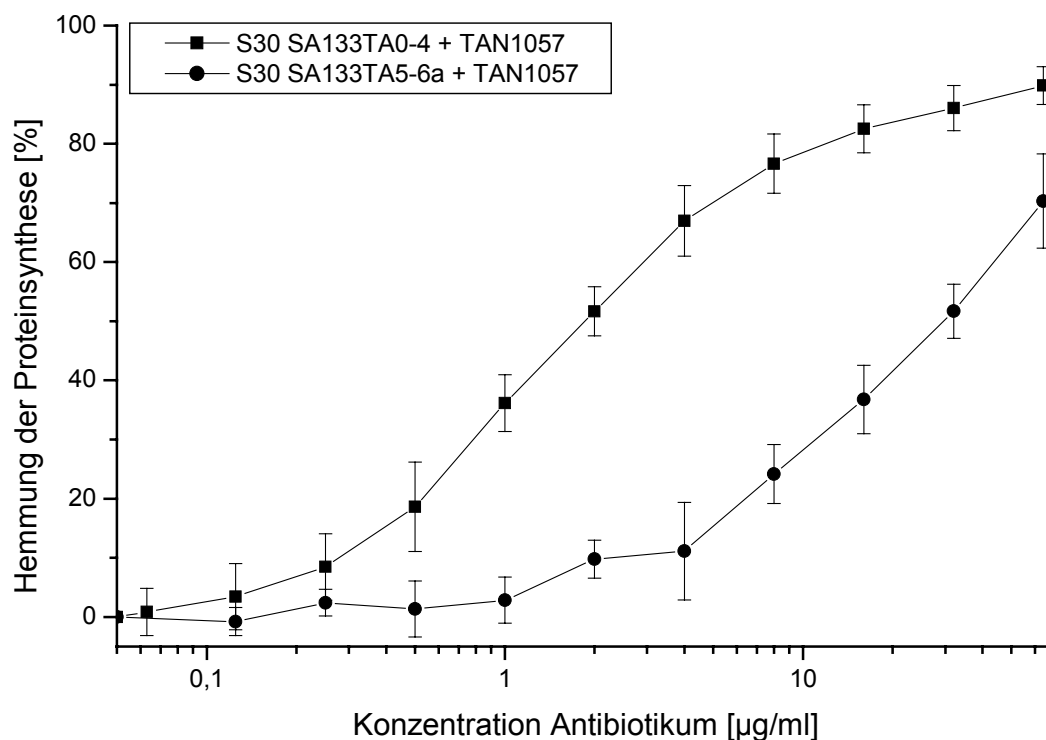


Abbildung 17: Hemmung der Proteinsynthese von TAN1057 in S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a. Die Datenpunkte der Kurven entsprechen den Mittelwerten der benannten Datenreihen, die Fehlerbalken indizieren Standardabweichung.

Die Analyse der IC_{50} -Werte des Translationsinhibitors Erythromycin zeigte keine signifikanten Unterschiede für den wildtypischen Ausgangsstamm SA133TA0 und die während der TAN1057-Resistenzentwicklung selektionierten TAN1057-resistenten Stämme SA133TA1 bis SA133TA6a:

S30-Extrakt	MW [µg/ml]	SD
SA133TA0	0,3	0,1
SA133TA1-6a	0,3	0,1

Tabelle 26: Statistische Analyse der IC_{50} -Werte von Erythromycin auf S30-Extrakte aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a.

Die IC_{50} -Mittelwerte lagen für den S30-Extrakt des TAN1057-sensitiven Ausgangsstammes SA133TA0 bei $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ Erythromycin, bei allen anderen Extrakten ebenfalls bei $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$. Die gleiche Unterteilung der IC_{50} -Werte wie in der vorherigen Abbildung verdeutlicht, dass sich die Daten beider Gruppen für Erythromycin nicht signifikant unterscheiden:

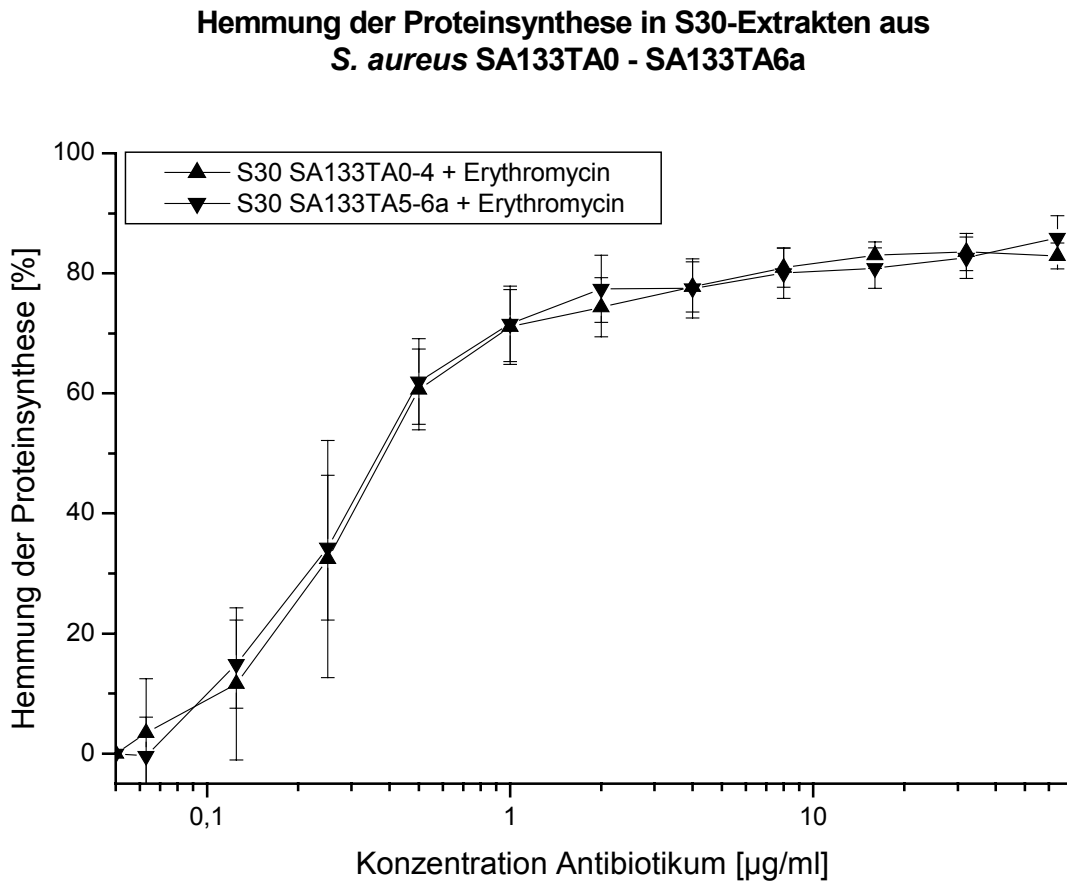


Abbildung 18: Hemmung der Proteinsynthese von Erythromycin in S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a. Die Datenpunkte der Kurven entsprechen den Mittelwerten der benannten Datenreihen, die Fehlerbalken indizieren Standardabweichung.

4.6.5 Gekoppelte Transkriptions-/Translations Experimente mit 70S- und S150-Fractionen aus *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a

Mit den durchgeführten T/T-Experimenten konnte ein Anstieg der IC₅₀-Werte in S30-Extrakten der *S. aureus* Stämme SA133TA5 – SA133TA6a nachgewiesen werden. S30-Extrakte stellen jedoch komplette Zellextrakte dar. Daher wurden S30-Extrakte aus dem TAN1057-sensitiven Stamm SA133TA0 und dem TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a durch Zentrifugation weiter fraktioniert. Die sedimentierte 70S-Fraktion enthielt die abzentrifugierten Ribosomen, die übrigen zellulären Bestandteile verblieben im S150-Überstand. In diesem T/T-Experiment wurden die Ribosomen aus den TAN1057-resistenten bzw. sensitiven *S. aureus* Stämmen SA133TA6a bzw. SA133TA0 mit den S150-Überständen aus den TAN1057-sensitiven Stamm SA133TA0 und dem TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a eingesetzt:

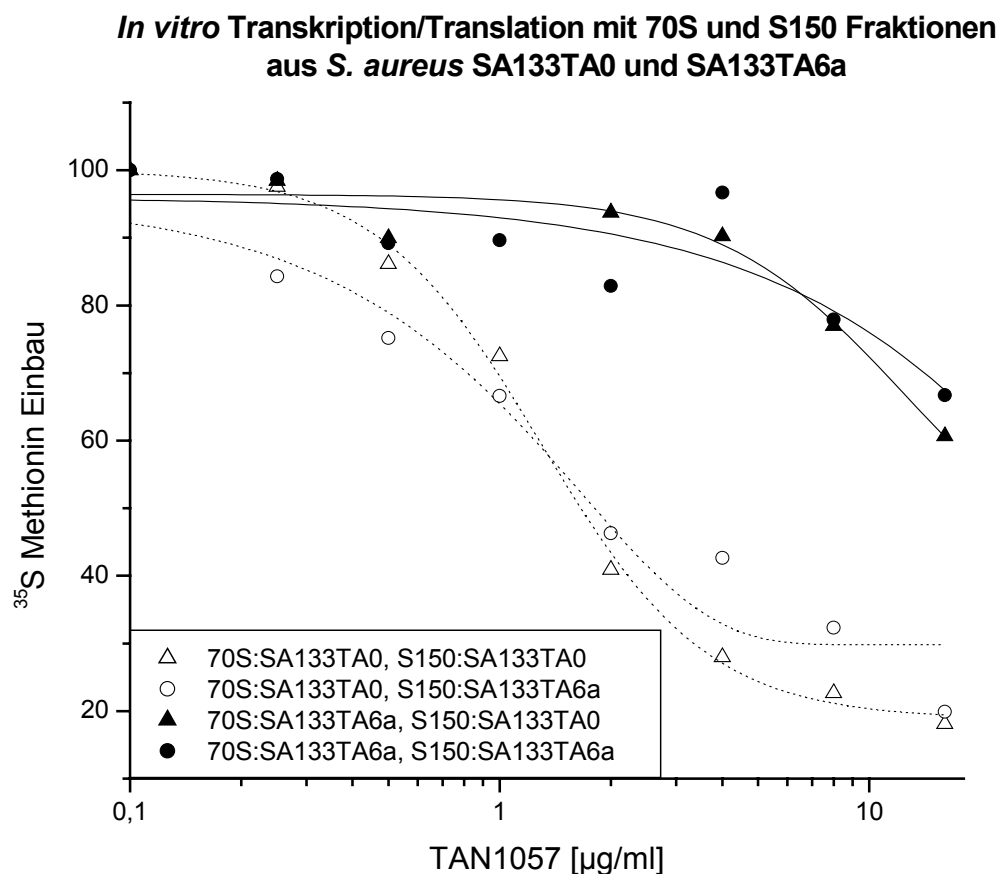


Abbildung 19: *In vitro* Transkription/Translation mit 70S- und S150-Fractionen aus SA133TA0 (MHK TAN1057=0,125 µg/ml) und SA133TA6a (MHK TAN1057= >64 µg/ml).

Die Transkriptions-/Translationsexperimente mit 70S und S150-Fractionen haben deutlich gezeigt, dass der erhöhte IC_{50} -Wert des S30-Extraktes aus *S. aureus* SA133TA6a gegenüber TAN1057 auf die 70S-Ribosomen zurückzuführen war. Sowohl mit der S150-Fraktion aus SA133TA0 als auch aus SA133TA6a zeigten diese Ribosomen einen deutlich erhöhten IC_{50} -Wert gegenüber TAN1057 ($IC_{50} > 16 \mu\text{g/ml}$). Dem entsprechend war die 70S-Fraktion aus SA133TA0 immer TAN1057-sensitiv ($IC_{50}=1,5 \mu\text{g/ml}$), unabhängig von der Herkunft der zugegebenen S150-Fractionen.

4.7 PCR-Amplifikation und Sequenzierung der 23S-rRNA Operons aus *S. aureus*

In den *in vitro* Transkriptions-/Translationsexperimenten wurde gezeigt, dass die Ribosomen der *S. aureus* Stämme SA133TA5 bis SA133TA6a eine erhöhte Resistenz gegen TAN1057 aufwiesen. In [17, 28] wurde gezeigt, dass TAN1057 auf die große ribosomale Untereinheit (50S) des bakteriellen Ribosoms wirkt. Sowohl die Zusammenlagerung der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit zum funktionalen Ribosom, als auch die Peptidyltransferase-Aktivität wurden durch TAN1057 gehemmt. Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der ribosomalen 23S-rRNA für den gemessenen Anstieg des IC_{50} -Wertes verantwortlich ist, wurde eine neuartige PCR-Strategie entwickelt, die in *S. aureus* die eindeutige Amplifikation aller rRNA-Operons über die flankierende genomische DNA ermöglichte. Die Sequenz der genomischen DNA des für die Resistenzentwicklung und den *in vitro* Transkriptions-/Translationsexperimenten verwendeten Stammes *S. aureus* 133 ist jedoch nicht bekannt. Das Design der PCR-Primer erfolgte daher anhand der bekannten Sequenzen der Stämme *S. aureus* Mu50, *S. aureus* N315 und *S. aureus* MW2.

Die Stämme *S. aureus* Mu50 und N315 besitzen 5 Kopien der 23S-rRNA [92]. Der Stamm *S. aureus* MW2 besitzt 6 Kopien der ribosomalen 23S-rRNA. Das in allen drei *S. aureus* Stämmen vorhandene Operon 2 weist im Falle des Stammes MW2 eine 16S-23S-5S Insertion im Operon 2 auf [8]. Die Bezeichnung der amplifizierten 23S-Operons und der flankierenden Gene erfolgte entsprechend der Nomenklatur des Stammes *S. aureus* Mu50. Die folgende Übersicht zeigt die Verteilung der rRNA-Operons in den drei *S. aureus* Stämmen Mu50, N315 und MW2. Die MW2-spezifische 16S-23S-5S Insertion im Operon 2 ist grau hinterlegt:

Operon 1, [rRNA02]:

Mu50: RecR-16S-23S-5S-SAV0481

N315: RecR-16S-23S-5S-SAV0481

MW2 : RecR-16S-23S-5S-SAV0481

Operon 2, [rRNA06]:

Mu50: LysS-5S-[tRNAcluster]-16S-I-23S-5S-SAV0518

N315: LysS-5S-[tRNAcluster]-16S-I-23S-5S-SAV0518

MW2 : LysS-5S-[tRNAcluster]-16S-I-23S-5S-16S-23S-5S-SAV0518

[tRNAcluster]: V-T-K-G-L-R-P-A

16S-23S-5S: *S. aureus* MW2 spezifische 23s rRNA Insertion

Operon 3, [rRNA09]:

Mu50: Tnp-[tRNAcluster]-5S-23S-A-I-16S-SAV1861

N315: Tnp-[tRNAcluster]-5S-23S-A-I-16S-SAV1861

MW2 : Tnp-[tRNAcluster]-5S-23S-A-I-16S-SAV1861

[tRNAcluster]: L-G-C-Q-H-W-Y-T-F-D-M-S-D-S-M-M-A-P-R-L-G-L-K-T-V

Operon 4, [rRNA12]:

Mu50: IlvA-5S-23S-16S-G-L-SAV2062

N315: IlvA-5S-23S-16S-G-L-SAV2062

MW2 : IlvA-5S-23S-16S-G-L-SAV2062

Operon 5, [rRNA15]:

Mu50: Arg-K-Q-Y-V-E-N-5S-23S-16S-SAV2165

N315: Arg-K-Q-Y-V-E-N-5S-23S-16S-SAV2165

MW2 : Arg-K-Q-Y-V-E-N-5S-23S-16S-SAV2165

Um eine eindeutige Sequenzierung aller rRNA-Operons zu gewährleisten, wurde eine PCR-Strategie entwickelt, welche die Amplifikation der 23S-rRNA Operons über die DNA der flankierenden DNA ermöglichte. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager so entworfen, dass sie in hochkonservierten DNA-Bereichen lagen, die in allen drei *S. aureus* Stämmen die Operons der 23S-rRNA flankierten, für jedes Operon eine eindeutige Amplifikation ermöglichten und zudem in den drei *S. aureus* Stämmen Mu50, N315 und MW2 die gleiche Sequenz aufwiesen.

Die Amplifikation der 23S-rRNA Operons erwies sich aufgrund der Größe der PCR-Fragmente von bis zu 6500 BP und dem hohen Grad an Sekundärstrukturen als schwierig. Verschiedene DNA-Polymerasen wurden getestet, die Amplifikation der 23S-rRNA Operons war jedoch lediglich mit der PCR-Polymerase „Herculase“ erfolgreich. Die Amplifikation der 23S-rRNA in für die Sequenzierung ausreichender Qualität und Menge erforderte weitreichende Optimierungen der PCR-Parameter. Dazu wurde die optimale Annealing-Temperatur der PCR-Primer für die Amplifikation der rRNA-Operons experimentell bestimmt. Die besten Ergebnisse wurden mit einer zweistufigen PCR-Amplifikation erzielt. Dabei wurden die ersten 10 Zyklen der Amplifikation mit einer reduzierten Annealing-Temperatur durchgeführt um eine bessere Bindung der PCR-Primer an die aufgeschmolzene genomische DNA zu ermöglichen. Die folgenden 25 Zyklen wurden mit einer höheren Annealing-Temperatur durchgeführt, um eine spezifischere Amplifikation der rRNA-Operons zu ermöglichen. Die Pufferbedingungen mussten in Vorversuchen ebenfalls optimiert werden. Die PCR-Amplifikation erzielte bei Zugabe von 3% DMSO die höchste Ausbeute an PCR-Produkt bei gleichzeitig erhöhter Produktspezifität.

Die rRNA-Operons rRNA02, rRNA06 und rRNA15 konnten mit den so ermittelten PCR-Parametern hervorragend amplifiziert werden.

Die Amplifikation der Operons rRNA09 und rRNA12 war hingegen schwieriger. Um ein spezifisches PCR-Produkt zu erzielen, musste die Amplifikation mit einer deutlich verringerten Annealing-Temperatur durchgeführt werden. Die dabei auftretenden Sekundärbanden machten es erforderlich, die spezifischen PCR-Produkte über ein präparatives Agarosegel von den Nebenprodukten zu trennen. Verschiedene PCR-Primer wurden alternativ entworfen und getestet, ohne die Schwierigkeiten grundlegend zu beheben. Die verwendeten PCR-Primer und die entsprechenden Bedingungen für die Amplifikation der 23S-rRNA Operons wurden in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Das bei *S. aureus* MW2 vorhandene, sechste Operon der ribosomalen RNA liegt als 16S-23S-5S Insertion innerhalb des rRNA06-Operons zwischen der 5S-rRNA und dem Protein SAV0518. Neben der bei *S. aureus* Mu50 und N315 sichtbaren 5248-BP Bande hätte ein 6. Operon mit einer genomischen Distribution wie in *S. aureus* MW2 eine Sekundärbande annähernd doppelter Größe (10422 BP) zeigen müssen. Eine solche Bande war nicht zu beobachten.

Mit Hilfe der vorgestellten PCR-Methode wurden die 5 ribosomalen Operons aus genomischer DNA der *S. aureus* Stämme SA133TA0 (MHK TAN1057: 0,125 µg/ml, IC₅₀ TAN1057: 1,5 µg/ml) und SA133TA6a (MHK TAN1057: > 64 µg/ml, IC₅₀ TAN1057: 19,3 µg/ml) spezifisch amplifiziert. Die 23S-rRNA Operons wurden für beide Stämme mittels Primer-Walking doppelsträngig sequenziert.

Die Sequenzdaten beider Stämme wurden auf Unterschiede zu einander untersucht und mit den veröffentlichten Sequenzen von *S. aureus* Mu50, N315 und MW2 verglichen. Folgende Sequenzunterschiede wurden dabei gefunden:

```

rRNA09 SA133TA0 ( 351) gaaagatgaatcaaagaaggtaataatcctgtagtcgaaaatggtgtctc
rRNA09 SA133TA6a ( 351) .....c.....
rRNA09 Mu50      ( 351) .....
rRNA09 N315     ( 351) .....
rRNA09 MW2      ( 351) .....

rRNA09 SA133TA0 (2301) acggaggcgctcaaaggttcctcagaatgggttgaaatcattcatagag
rRNA09 SA133TA6a (2301) .....t.....
rRNA09 Mu50      (2301) .....
rRNA09 N315     (2301) .....
rRNA09 MW2      (2301) .....

```

Die Sequenz der 23S-rRNA aus dem Operon rRNA09 des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamms SA133TA6a zeigte zwei Basenaustausche im Vergleich zum TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0, die zur Ausbildung von schwachen Basenpaarungen [98, 99] in der Sekundärstruktur der 23S-rRNA führten. Die Sequenzen der veröffentlichten *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 sind an diesen Positionen identisch mit denen des TAN1057-sensitiven Ausgangsstammes der Resistenzentwicklung *S. aureus* 133.

Die Mutation U392C führte zur Ausbildung einer schwachen Basenpaarung C=A der ribosomalen 23S-rRNA (A), die Mutation C2321U zur Ausbildung einer schwachen Basenpaarung U=G (B):

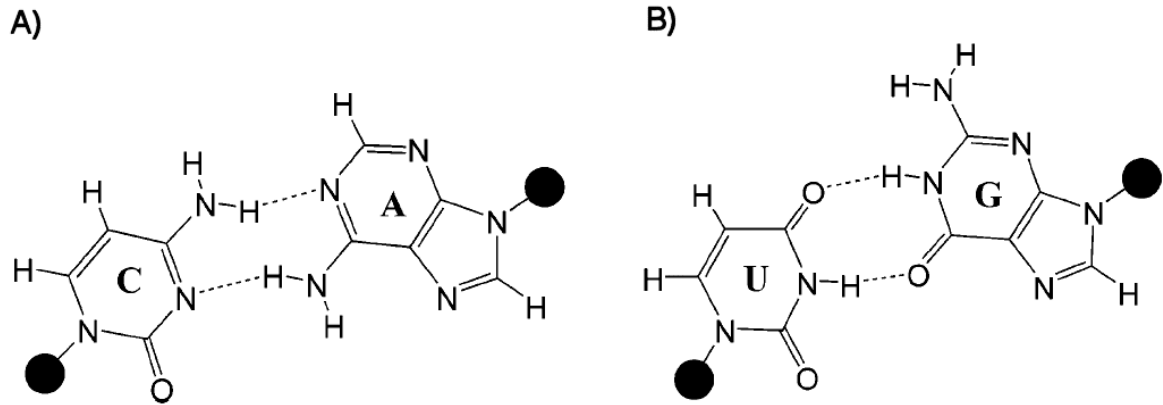


Abbildung 20: Schwache Basenpaarung C=A in Helix 18 / Domäne I der 23S-rRNA durch die Mutation U392C (A) und schwache Basenpaarung U=G in Helix 83 / Domäne V der 23S-rRNA durch die Mutation C2321U (B). Abbildungen modifiziert nach: [99]

Die folgende Abbildung zeigt die genaue Position der durch die Punktmutation U392C verursachte schwache Basenpaarung C=A innerhalb von Helix 18 / Domäne I der 23S-rRNA von *S. aureus*:

Secondary Structure: large subunit ribosomal RNA - 5' half

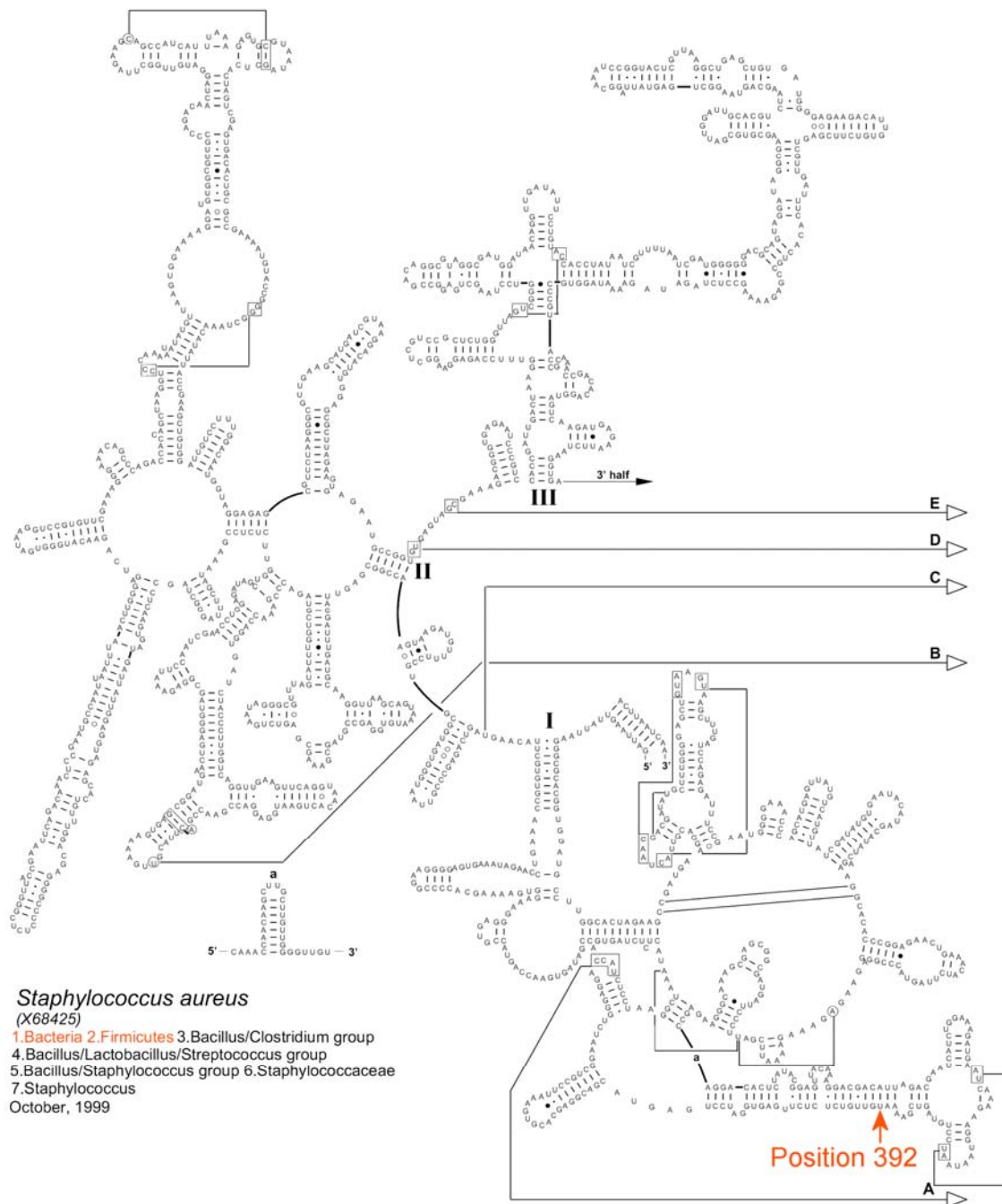


Abbildung 21: Sekundärstruktur der 5' Hälfte der großen ribosomalen Untereinheit mit markierter Position 392 (U->C). Quelle: modifiziert nach [24]

Die Punktmutation C2321U führte zur Ausbildung einer schwachen Basenpaarung U=G innerhalb der Helix 83 / Domäne V der 23S-rRNA in einem dem Peptidyltransferasezentrum angrenzenden Bereich:

Secondary Structure: large subunit ribosomal RNA - 3' half

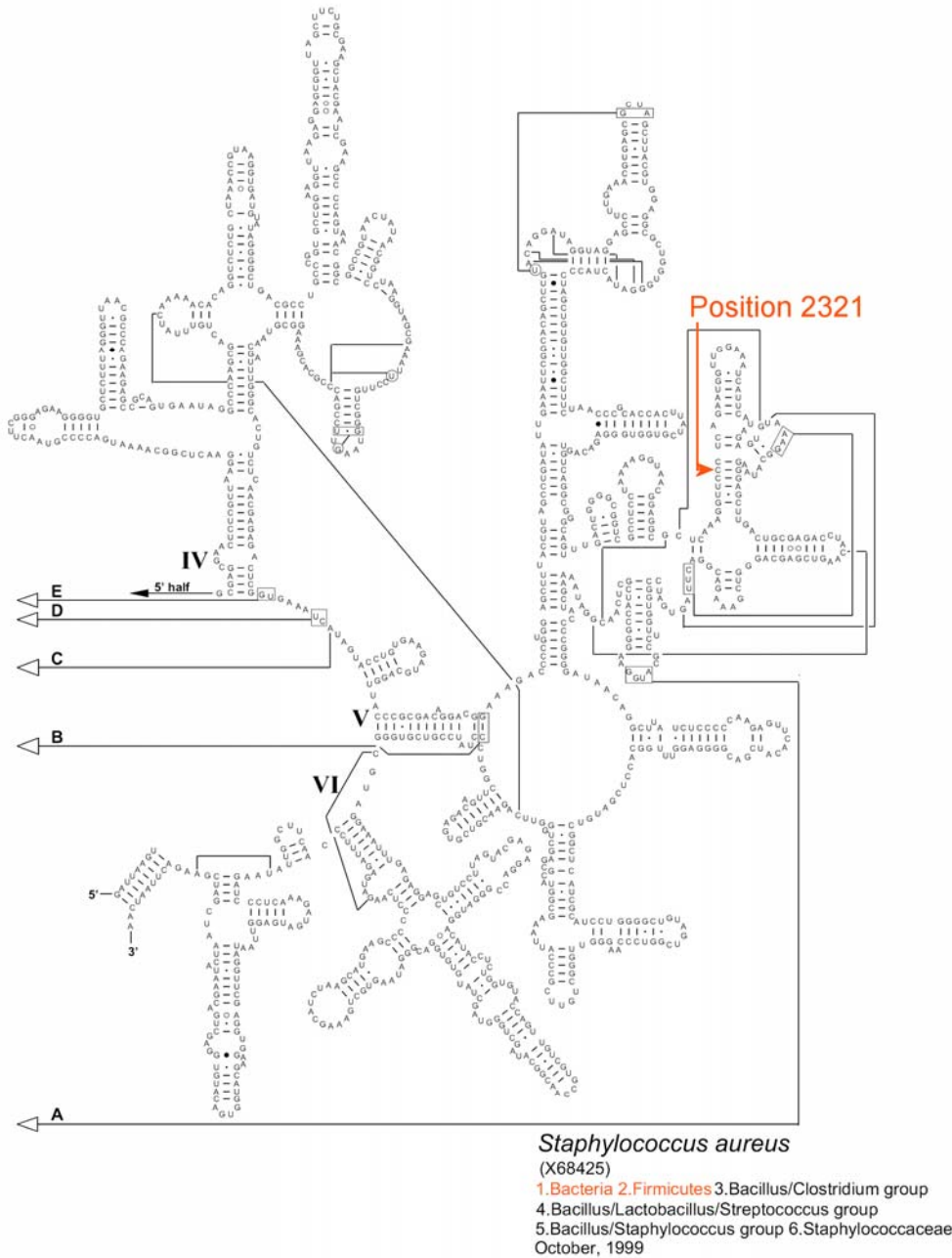


Abbildung 22: Sekundärstruktur der 3' Hälfte der großen ribosomalen Untereinheit mit markierter Position 2321 (C->U). Quelle: modifiziert nach [24]

Um zu untersuchen, wann die gefundenen Punktmutationen erstmalig in der Sequenz des 23S-rRNA Operons rRNA09 auftraten, wurde das Operon rRNA09 aus allen Zwischenstufen der Resistenzentwicklung SA133TA sequenziert:


```

rRNA09 SA133TA0 ( 351) gaaagatgaatcaaagaaggaataataatcctgtagtcgaaaaatggtgtctc
rRNA09 SA133TA1 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA2 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA3 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA4 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA5 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA6 ( 351) .....
rRNA09 SA133TA6a ( 351) .....c.....

rRNA09 SA133TA0 (2301) acggaggcgctcaaaggttcctcagaatggttggaaatcattcatagag
rRNA09 SA133TA1 (2301) .....
rRNA09 SA133TA2 (2301) .....
rRNA09 SA133TA3 (2301) .....
rRNA09 SA133TA4 (2301) .....
rRNA09 SA133TA5 (2301) .....
rRNA09 SA133TA6 (2301) .....
rRNA09 SA133TA6a (2301) .....t.....

```

Die beiden Punktmutationen des rRNA09-Operons traten erst im Stamm SA133TA6a auf, alle vorherigen Stämme der Resistenzreihen SA133TA zeigten die Sequenz des Ausgangsstammes SA133TA0. Dies zeigte, dass die beiden gefundenen Punktmutationen U392C und C2321U erst nach der TAN1057-Resistenzselektion, während der sechstägigen Überimpfung des Stammes SA133TA6 in reinem FKS-Medium aufgetreten sind. Beide Punktmutationen kamen nicht als Auslöser des sequentiellen Anstiegs der TAN1057-Resistenz während der sechstägigen Selektion in Frage. Der sprunghafte Anstieg der ribosomal vermittelten TAN1057-Resistenz in den S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA5 und SA133TA6 konnte ebenfalls nicht durch diese Punktmutationen der 23S-rRNA ausgelöst worden sein.

Um zu klären, ob die beiden Punktmutationen auch in anderen, unabhängig durchgeführten TAN1057-Resistenzselektionen beobachtet werden konnten, wurden die 5 Operons der TAN1057-resistenten Stämme SA133TB6, SA133TC6, SA133TD6, SA133TE6 und SA133TF6 an den entsprechenden Positionen ebenfalls sequenziert und verglichen. Aus den *S. aureus* Stämmen SA4220A6, SA4220B6 und SA4220C6 ließen sich nur die Operons rRNA02, rRNA06 und rRNA15 für die Sequenzierung amplifizieren. Die PCR-Amplifikation der Operons rRNA09 und rRNA12 erbrachten kein spezifisches PCR-Produkt.

Die Operons rRNA02, rRNA06, rRNA09, rRNA12 und rRNA15 aus *S. aureus* SA133TB und SA133TC (MHK TAN1057: > 64 µg/ml FKS) und die Operons rRNA02, rRNA06 und rRNA15 aus *S. aureus* SA4220TA6 und SA4220TB6 (MHK TAN1057 > 64 µg/ml FKS) im Bereich der Basen 392 und 2321 wurden mit der Sequenz des Operons rRNA09 aus *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a verglichen:

```

rRNA09 SA133TA0 ( 351) gaaagatgaatcaaagaaggtaataatcctgtagtcgaaaaatggttgctc
rRNA09 SA133TA6a ( 351) .....c.....
rRNA02 SA133TB6 ( 351) .....
rRNA06 SA133TB6 ( 351) .....
rRNA09 SA133TB6 ( 351) .....
rRNA12 SA133TB6 ( 351) .....
rRNA15 SA133TB6 ( 351) .....
rRNA02 SA133TC6 ( 351) .....
rRNA06 SA133TC6 ( 351) .....
rRNA09 SA133TC6 ( 351) .....
rRNA12 SA133TC6 ( 351) .....
rRNA15 SA133TC6 ( 351) .....
rRNA02 SA4220TA6 ( 351) .....
rRNA06 SA4220TA6 ( 351) .....
rRNA15 SA4220TA6 ( 351) .....
rRNA02 SA4220TB6 ( 351) .....
rRNA06 SA4220TB6 ( 351) .....
rRNA15 SA4220TB6 ( 351) .....

rRNA09 SA133TA0 (2301) acggaggcgctcaaaggttccctcagaatggttggaatcattcatagag
rRNA09 SA133TA6a (2301) .....t.....
rRNA02 SA133TB6 (2301) .....
rRNA06 SA133TB6 (2301) .....
rRNA09 SA133TB6 (2301) .....
rRNA12 SA133TB6 (2301) .....
rRNA15 SA133TB6 (2301) .....
rRNA02 SA133TC6 (2301) .....
rRNA06 SA133TC6 (2301) .....
rRNA09 SA133TC6 (2301) .....
rRNA12 SA133TC6 (2301) .....
rRNA15 SA133TC6 (2301) .....
rRNA02 SA4220TA6 (2301) .....
rRNA06 SA4220TA6 (2301) .....
rRNA15 SA4220TA6 (2301) .....
rRNA02 SA4220TB6 (2301) .....
rRNA06 SA4220TB6 (2301) .....
rRNA15 SA4220TB6 (2301) .....

```

Die Sequenz der analysierten rRNA-Operons entsprach an Position 392 und 2321 der wildtypischen *S. aureus* Sequenz. Die bei dem TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a im Operon rRNA09 gefundenen Punktmutationen konnte weder bei den TAN1057-resistenten Stämmen SA133TB6 und SA133TC6 noch bei den TAN1057-resistenten Stämmen SA4220TA6 und SA422TB6 beobachtet werden.

4.8 PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Pseudouridinsynthase-Gene in *S. aureus*

Wie in Kapitel 1.1.6.3 dargelegt, gibt es verschiedene Möglichkeiten der posttranskriptionellen Modifikation der ribosomalen RNA.

Posttranskriptionelle Methylierungen der ribosomalen RNA erfolgen durch Methyltransferasen. Methyltransferasen der erm-Gruppe führen zur antibakteriellen Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B (MLSB-Phänotyp) [22]. Die erm-Methyltransferasen werden durch horizontalen Gentransfer mittels Plasmiden oder Transposons zwischen Bakterienstämmen übertragen [21, 74]. Aufgrund der *in vitro* Resistenzselektion und der fehlenden Kreuzresistenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber Makrolidantibiotika (Kapitel 4.4) wurde die Methylierung der ribosomalen RNA durch bekannte Methyltransferasen der erm-Gruppe als Ursache für die selektionierte TAN1057-Resistenz nicht in Erwägung gezogen.

In Kapitel 1.1.6.3 wurde beschrieben, dass auch Pseudouridinsynthasen posttranskriptionelle Modifikationen der ribosomalen RNA katalysieren. Viele Pseudouridinsynthasen modifizieren die 23S-rRNA in unmittelbarer Nähe zum Peptidyltransferasezentrum und spielen eine strukturelle Rolle in der Peptidyltransferase-Reaktion [95, 96]. Daher wurde als Ursache für die selektionierte TAN1057-Resistenz in *S. aureus* auch die Möglichkeit einer Veränderung der posttranskriptionellen Synthese von Pseudouridinen in Betracht gezogen. Posttranskriptionelle Modifikationen der ribosomalen RNA können nicht durch die Sequenzierung der rRNA-Operons nachgewiesen werden. Daher wurden die Operons der in *S. aureus* vorkommenden Pseudouridinsynthasen aus dem TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a und dem TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0 sequenziert und auf Unterschiede der Aminosäuresequenz untersucht.

4.8.1 Primer-Design und PCR-Amplifikation

Zur Amplifikation der sieben in *S. aureus* bekannten Pseudouridinsynthasen wurden spezifische PCR-Primer entworfen. Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Pseudouridinsynthase-Operons werden in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die Amplifikation der Pseudouridinsynthase-Operons wurde mit genomischer DNA der *S. aureus* Stämme SA133TA0 (MHK TAN1057: 0,125 µg/ml, IC₅₀ TAN1057: 1,5 µg/ml) und SA133TA6a (MHK TAN1057: >64 µg/ml, IC₅₀ TAN1057: 19,3 µg/ml) durchgeführt. Die sieben Operons wurden für beide Stämme doppelsträngig sequenziert und auf Sequenzunterschiede analysiert.

4.8.2 Sequenzanalyse der Pseudouridinsynthasen

Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte durch den Vergleich der Sequenzdaten auf DNA- und Proteinebene mit den entsprechenden Operons und Proteinen aus den *S. aureus* Stämmen Mu50, N315 und MW2:

Pseudouridin-Synthase	Größe [AAs]	Sequenzunterschiede der Pseudouridinsynthasen aus SA133TA0 zu			
		SA133TA6a	Mu50	N315	MW2
SAV1008	284	0	2	2	3
SAV1197	305	0	2	2	1
SAV1753	231	0	4	4	5
SAV1850	234	0	1	1	1
RluB	245	0	0	0	0
TruA	267	1	6	6	7
TruB	305	0	3	3	3

Tabelle 27: Differenzen in der Aminosäuresequenz aller sieben Pseudouridinsynthasen aus *S. aureus* SA133TA6a, Mu50, N315 und MW2 im Vergleich zum TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stamm SA133TA0.

Im Vergleich zu den hoch konservierten Sequenzen der ribosomalen RNA wiesen die Sequenzen der Pseudouridinsynthasen sowohl auf DNA- als auch auf Aminosäure-Ebene eine wesentlich höhere genetische Varianz auf.

Sequenzunterschiede der *S. aureus* Pseudouridinsynthasen auf Aminosäure-Ebene zwischen dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a und dem TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0 wurden nur für das Protein TruA festgestellt. An Position 14 der TruA-Aminosäuresequenz trat während der TAN1057-Resistenzselektion die Punktmutation F14Y auf:

```

TruASA133TA0 ( 1) mriIveIayqgnnflgfqiqqngrtvqqqfekllqrmhkrhvrihpsrt
TruASA133TA6a ( 1) .....y.....
TruAMuU50 ( 1) .....
TruAN315 ( 1) .....
TruAMW2 ( 1) .....

TruASA133TA0 ( 51) drgvhaiqqyfhhfdtelnipmsqwqyamnrtpddiyvnnvvtvdddfhc
TruASA133TA6a ( 51) .....
TruAMuU50 ( 51) .....
TruAN315 ( 51) .....
TruAMW2 ( 51) .....

TruASA133TA0 ( 101) rydcvgkryrykvyaqhrdpfqsglktfipetldldkmkraaqqfigth
TruASA133TA6a ( 101) .....
TruAMuU50 ( 101) .....n.....
TruAN315 ( 101) .....n.....
TruAMW2 ( 101) .....n.....

TruASA133TA0 ( 151) dftgfcsqkteveskvrtlyqseilktddgfdyivtgsgflynmvrvlva
TruASA133TA6a ( 151) .....
TruAMuU50 ( 151) .....v.....
TruAN315 ( 151) .....v.....
TruAMW2 ( 151) .....v.....

TruASA133TA0 ( 201) flievqkgrhdvsdvpklllesknrknvpftapaeglylekiyldenelik
TruASA133TA6a ( 201) .....
TruAMuU50 ( 201) .....ei.....l.....
TruAN315 ( 201) .....ei.....l.....
TruAMW2 ( 201) .....ei.....t.....l.....

TruASA133TA0 ( 251) dfgndikihrkkslqnd
TruASA133TA6a ( 251) .....
TruAMuU50 ( 251) .....
TruAN315 ( 251) .....
TruAMW2 ( 251) .....

```

Ein Vergleich der entsprechenden Basensequenz des offenen Leserasters der Pseudouridinsynthase TruA aus *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a zeigt die zu Grunde liegende Punktmutation T41A:

```
truASA133TA0 ( 1) atgcgtatattagtagaaaattgcgtatcaaggaaataattttctagggtt
truASA133TA6a ( 1) .....a.....
```

Zur genaueren Bestimmung des Mutationszeitpunktes wurden die TruA-Operons aus den *S. aureus* Stämmen SA133TA1-SA133TA6 ebenfalls sequenziert. Darüber hinaus erfolgte die Sequenzierung des TruA-Operons aus den in unabhängigen TAN1057-Resistenzreihen selektionierten *S. aureus* Stämmen SA133TB6, SA133TC6, SA133TD6, SA4220TA6, SA4220TB6 und SA4220TC6:

```
TruASA133TA0 ( 1) mrilveiayqgnnflgfgiqqngrtvqqqfekllqrmhkrhvrihpsrt
TruASA133TA1 ( 1) .....
TruASA133TA2 ( 1) .....
TruASA133TA3 ( 1) .....
TruASA133TA4 ( 1) .....
TruASA133TA5 ( 1) .....
TruASA133TA6 ( 1) .....
TruASA133TA6a ( 1) .....y.....
TruASA133TB6 ( 1) .....
TruASA133TC6 ( 1) .....
TruASA133TD6 ( 1) .....
TruASA4220TA6 ( 1) .....
TruASA4220TB6 ( 1) .....
TruASA4220TC6 ( 1) .....

```

Der Vergleich zeigte, dass die beobachtete Punktmutation in der Resistenzreihe SA133TA erst im Stamm SA133TA6a zu beobachten war. Vom Ausgangsstamm *S. aureus* SA133TA0 bis zum TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6 wiesen die TruA-Proteinsequenzen die wildtypische Aminosäure auf. In den TruA-Operons der Stämme SA133TB, SA133TC, SA133TD, SA4220TA, SA4220TB und SA4220TC aus unabhängigen Resistenzreihen konnte die Mutation ebenfalls nicht beobachtet werden.

4.8.2.1 Phylogenetische Untersuchung der Pseudouridinsynthese TruA

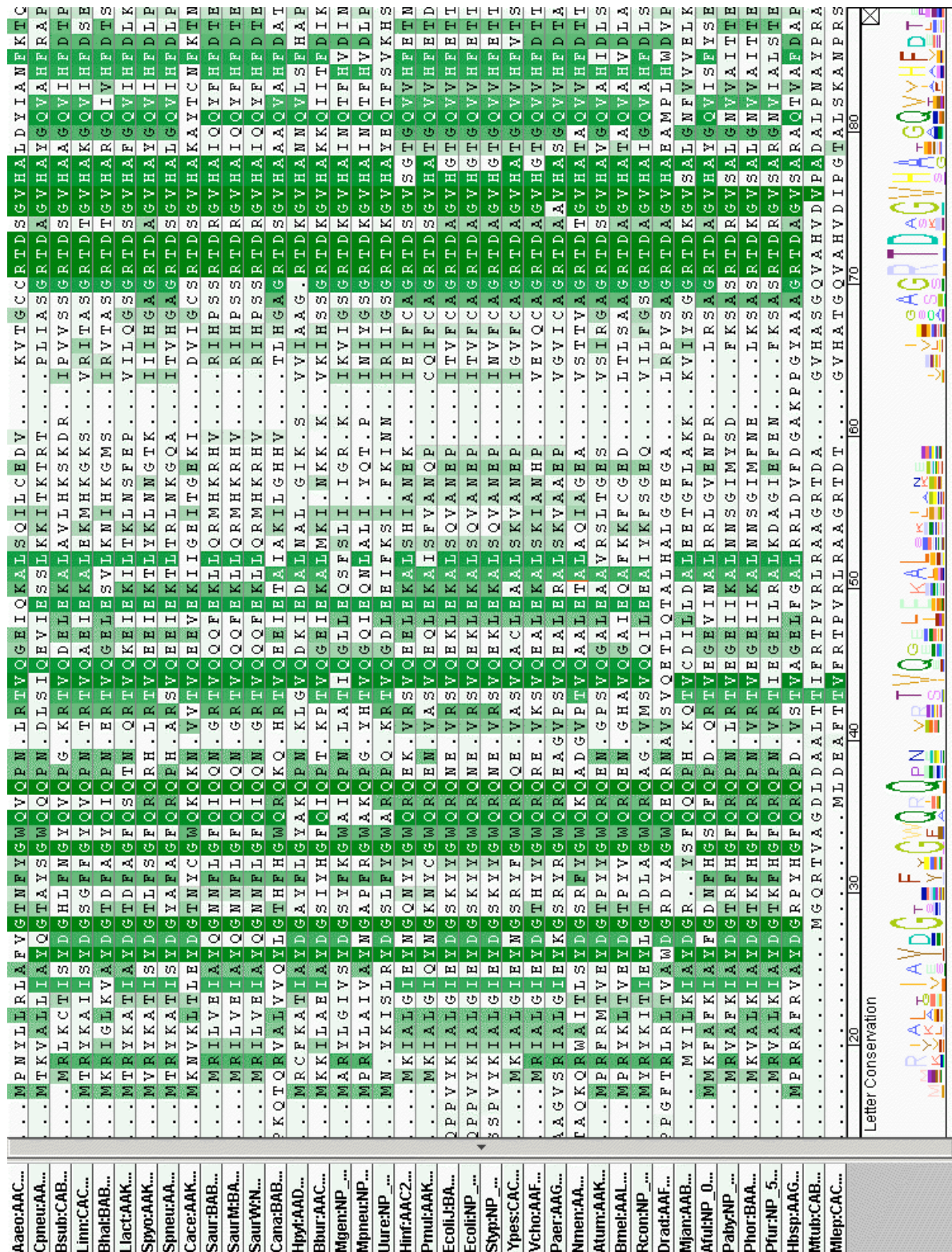


Abbildung 23: Phylogenetischer Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Pseudouridinsynthese TruA. Nomenklatur der verwendeten Organismen: siehe Kapitel 3.5

Der phylogenetische Vergleich zeigt, dass an Position 14 der Aminosäuresequenz (an Position 31 der Abbildung) der Pseudouridinsynthase TruA bei den meisten der für den Vergleich verwendeten Organismen die Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin codiert sind. Typischerweise besitzen die untersuchten Stämme der Firmicutes-Gruppe (Bacillus/Clostridium) an dieser Position wie *S. aureus* auch die Aminosäure Phenylalanin - mit Ausnahme von *Clostridium acetobutylicum* und dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a.

Die Mutation F14Y der Pseudouridinsynthase TruA in *S. aureus* SA133TA6a zeigt, dass der Austausch eines Phenylalanins durch ein Tyrosin an dieser Position ohne erkennbare phänotypische Auswirkungen möglich ist, und die Mutation der Pseudouridinsynthase TruA nicht als Ursache der selektierten TAN1057-Resistenz betrachtet werden konnte.

4.9 PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Operons aller ribosomalen L-Proteine in *S. aureus*

Mittels der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion wurde gezeigt, dass trotz des sequentiellen, mehrstufigen Resistenzanstiegs während der sechstägigen TAN1057-Selektion auf ribosomaler Ebene nur ein einstufiger Anstieg der ermittelten IC_{50} -Werte zu beobachten war.

Bakterielle Antibiotikaresistenzen können durch Mutationen der ribosomalen L-Proteine verursacht werden [25, 52, 130, 167]. Ribosomale Proteine sind in *S. aureus* zum überwiegenden Teil nur einmal codiert. Die einzige Ausnahme bildet das Protein L33 mit zwei chromosomalen Operons. Eine resistenzvermittelnde Mutation in einem ribosomalen L-Protein würde daher zu einer homogenen, antibiotikaresistenten Ribosomenpopulation führen, die wie im Fall der IC_{50} -Werte der TAN1057-Resistenzselektion als einstufiger Anstieg der ribosomalen Resistenz in den gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktionen zu beobachten wäre.

Eine systematische Suche nach resistenzvermittelnden Mutationen in allen ribosomalen L-Proteinen ist in *S. aureus* nicht beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit für selektierte TAN1057-resistente *S. aureus* Stämme erstmalig durchgeführt. Dazu wurden PCR- und Sequenzierungsprimer für sämtliche L-Proteine aus *S. aureus* entworfen.

Die Operons der ribosomalen L-Proteine aus dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a (MHK TAN1057: >64 µg/ml, IC₅₀ TAN1057: 19,3 µg/ml) wurden mittels dieser Primer spezifisch amplifiziert, sequenziert und mit den Sequenzen der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 verglichen. Bei Abweichung einer L-Protein Sequenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber der Sequenz der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 wurde die Sequenz des TAN1057-sensitiven Ausgangsstammes SA133TA0 der Resistenzentwicklung ermittelt und für den Vergleich herangezogen.

4.9.1 Primer-Design und PCR-Amplifikation

Einige L-Proteine in *S. aureus* sind in komplexen Operons gruppiert. Diese Operons wurde als Ganzes amplifiziert und sequenziert. Für alle anderen Operons wurden spezifische Primer zur PCR-Amplifikation entworfen. Die verwendeten PCR-Primer und die entsprechenden Bedingungen für die Amplifikation der L-Protein Operons werden in Kapitel 3.3.5 beschrieben. Alle Operons der L-Proteine aus *S. aureus* wurden unter den aufgeführten PCR-Bedingungen amplifiziert und ergaben in allen Fällen saubere PCR-Fragmente der erwarteten Größe, die daraufhin mit den PCR-Primern bzw. den aufgeführten Sequenzierungsprimern sequenziert wurden.

4.9.2 Sequenzanalyse der ribosomalen L-Proteine

Die folgende Abbildung fasst die während der Sequenzierung aller ribosomalen L-Proteine gefundenen Unterschiede in der Aminosäuresequenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a zu den Stämmen SA133TA0, Mu50, N315 und MW2 zusammen:

Operon	Protein	Größe [AAs]	Unterschiede in der Aminosäuresequenz von <i>S. aureus</i> SA133TA6a zu			
			Mu50	N315	MW2	SA133TA0
rplA	L1	230	0	0	0	
rplI	L9	148	1	1	1	0
rplJ	L10	166	0	0	0	
rplK	L11	140	0	0	0	
rplL	L7/L12	122	0	0	0	
rplM	L13	145	0	0	0	
rplQ	L17	122	0	0	0	
rplS	L19	116	1	1	0	0
rplU	L21	102	0	0	0	
rplV	L22	117	0	0	0	
rplY	L25	217	0	0	0	
rpmA	L27	99	5	0	0	0
rpmB	L28	62	0	0	0	
rpmE	L31	84	0	0	0	
rpmF	L32	57	0	0	0	
rpmG	L33	49	0	0	0	
rpmG (2)	L33 (2)	49	0	0	0	
rpmH	L34	50	0	0	0	
rpmJ	L36	37	0	0	0	
rplB-rplW-rplD-rplC	L2	277	1	1	1	1
rplB-rplW-rplD-rplC	L23	91	0	0	0	
rplB-rplW-rplD-rplC	L4	207	0	0	0	
rplB-rplW-rplD-rplC	L3	220	2	2	2	2
rplE-rplX-rplN	L5	163	0	0	0	
rplE-rplX-rplN	L24	122	0	0	0	
rplE-rplX-rplN	L14	105	0	0	0	
rplO-rpmD	L15	146	0	0	0	
rplO-rpmD	L30	59	0	0	0	
rplR-rplF	L18	119	0	0	0	
rplR-rplF	L6	178	0	0	0	
rplT-rpml	L20	118	0	0	0	
rplT-rpml	L35	66	0	0	0	
rpmC-rplP	L29	69	0	0	0	
rpmC-rplP	L16	144	0	0	0	

Tabelle 28: Differenzen in der Aminosäuresequenz aller ribosomalen L-Proteine des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamms SA133TA6a zu den Stämmen Mu50, N315, MW2 und SA133TA0.

4.9.2.1 Das ribosomale Protein L9

Das 148 Aminosäuren lange ribosomale Protein L9 des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a und des TAN1057-sensitiven Stammes SA133TA0 zeigte an Position 23 beider Proteine die Aminosäure Isoleucin. Im Gegensatz dazu trugen die L9-Proteine der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 an Position 23 die Aminosäure Valin. Der Vergleich zeigt eine natürlich vorkommende Varianz an Position 23 des ribosomalen Proteins L9:

```
L9 SA133TA6a ( 1) mkviftqdvkkgkgekvevpiigyannflkknyaveatpgnlkqlelq
L9 SA133TA0 ( 1) .....i.....
L9 Mu50 ( 1) .....v.....
L9 N315 ( 1) .....v.....
L9 MW2 ( 1) .....v.....
```

4.9.2.2 Das ribosomale Protein L19

Ein ähnliche Bild zeigte die Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L19 mit 116 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen der *S. aureus* Stämme SA133TA0, SA133TA6a und MW2 zeigten an Position 48 die Aminosäure Valin. Im Gegensatz dazu wies die Sequenz des L19-Proteins aus *S. aureus* Mu50 und N315 an dieser Position ein Isoleucin auf. Auch dies verdeutlichte, dass in *S. aureus* an Position 48 beide Aminosäuren, Valin und Isoleucin natürlich vorkommen:

```
L19 SA133TA6a ( 1) mtnhklieavtksqlrtdlpsfrpgdtrlrvhvriiegtreriqvfegvi
L19 SA133TA0 ( 1) .....v.....
L19 Mu50 ( 1) .....i.....
L19 N315 ( 1) .....i.....
L19 MW2 ( 1) .....v.....
```

4.9.2.3 Das ribosomale Protein L27

Die ribosomalen Proteine L27 mit einer Länge von 99 Aminosäuren aus *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a unterschieden sich in der Sequenz nicht von einander. Sie teilten diese Sequenzhomologie mit den L27-Proteinen aus *S. aureus* N315 und MW2. Das ribosomale Protein L27 von Mu50 unterschied sich N-terminal jedoch stark von den Sequenzen der anderen *S. aureus* Stämme - ohne Relevanz für die TAN1057-Resistenz:

Ergebnisse

```
L27 SA133TA0 ( 1) vrcipmlklnlqffaskkgvsstkngrdseskrlgakradgqfvtggsil
L27 SA133TA6a ( 1) .....
L27 Mu50 ( 1) .w..t.v.id.....
L27 N315 ( 1) .....
L27 MW2 ( 1) .....

L27 SA133TA0 ( 51) yrqrgtkiypgenvgrggddtlfakidgvvkferkgrdkkqvsvyavae
L27 SA133TA6a ( 51) .....
L27 Mu50 ( 51) .....
L27 N315 ( 51) .....
L27 MW2 ( 51) .....
```

4.9.2.4 Das ribosomale Protein L3

Das ribosomale Protein L3 aus dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a zeigte zwei veränderte Aminosäuren im Vergleich zum TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0, G152R und T179A. Die entsprechenden Sequenzen der drei *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2 zeigten die Sequenz des TAN1057-sensitiven Ausgangsstammes der Resistenzentwicklung:

```
L3 SA133TA0 ( 1) mtkgilgrkigmtqvfgengelipvtvveakenvvlqkktvevdgynaiq
L3 SA133TA6a ( 1) .....
L3 Mu50 ( 1) .....
L3 N315 ( 1) .....
L3 MW2 ( 1) .....

L3 SA133TA0 ( 51) vgfedkkaykkdaksnknyankpaeghakkadaapkrfirefrnvdvdaye
L3 SA133TA6a ( 51) .....
L3 Mu50 ( 51) .....
L3 N315 ( 51) .....
L3 MW2 ( 51) .....

L3 SA133TA0 ( 101) vqgevsvdtfvagdvidvtgvskgkgfqqgaikrhgqsrqgpmshgshfhra
L3 SA133TA6a ( 101) .....
L3 Mu50 ( 101) .....
L3 N315 ( 101) .....
L3 MW2 ( 101) .....

L3 SA133TA0 ( 151) pgsvglmasdasrvfkgqkmpgrmgntvtvqnlevvqvdenkvilvkgn
L3 SA133TA6a ( 151) .r.....a.....
L3 Mu50 ( 151) .r.....r.....
L3 N315 ( 151) .r.....r.....
L3 MW2 ( 151) .r.....r.....
```

```

L3 SA133TA0 ( 201) vpgpkkgglveirtsikkgnk
L3 SA133TA6a ( 201) .....
L3 Mu50 ( 201) .....
L3 N315 ( 201) .....
L3 MW2 ( 201) .....

```

Während der Resistenzentwicklung von *S. aureus* SA133TA gegen TAN1057 führten zwei Punktmutationen im Operon des ribosomalen Proteins L3 zum Austausch von zwei Aminosäuren. Der Vergleich des L3-Operons der *S. aureus* Stämme SA133TA0 und SA133TA6a auf DNA-Ebene zeigte die beiden entsprechenden Punktmutationen G454C und A535G. Zusätzlich waren zwei stille Mutationen, T414C und T465C zu beobachten:

```

L3 SA133TA0 ( 1) atgaccaaaggaatcttaggaagaaaaattgggatgacacaagtattcgg
L3 SA133TA6a ( 1) .....

L3 SA133TA0 ( 51) agaaaacgggtgaattaatccctgtaacagtagtagaagctaaagaaaatg
L3 SA133TA6a ( 51) .....

L3 SA133TA0 ( 101) ttgtattacaaaagaaaactgtagaagttgatggatacaacgcaatccaa
L3 SA133TA6a ( 101) .....

L3 SA133TA0 ( 151) gttggatttgaagacaaaaaagcatacaaaaaagatgcaaaatctaataa
L3 SA133TA6a ( 151) .....

L3 SA133TA0 ( 201) atatgctaataaaccagctgaagggtcacgctaaaaaagctgacgcgac
L3 SA133TA6a ( 201) .....

L3 SA133TA0 ( 251) ctaagcgcttcattcgtgaattccgcaatgtagacgtggatgcttacgaa
L3 SA133TA6a ( 251) .....

L3 SA133TA0 ( 301) gtaggtcaagaagtctcagtagatactttttagctggcgacgttattga
L3 SA133TA6a ( 301) .....

L3 SA133TA0 ( 351) cgtaacaggcgtatcaaaaggtaaagggttccaagggtgcaattaaacgcc
L3 SA133TA6a ( 351) .....

L3 SA133TA0 ( 401) acggacaatctcgtggacctatgtcacacgggttctcatttccacagagca
L3 SA133TA6a ( 401) .....c.....

L3 SA133TA0 ( 451) ccagggttctgtaggtatggcttcagatgcttctagagtatttaaaggcca
L3 SA133TA6a ( 451) ...c...c.....

```

Ergebnisse

```
L3 SA133TA0 ( 501) aaaaatgccaggacgtatgggtggaaacactgtaactggttcaaaacttag
L3 SA133TA6a ( 501) .....g.....

L3 SA133TA0 ( 551) aagtagttcaagttgacacagaaaacaaagttatcttagtaaaaggtaac
L3 SA133TA6a ( 551) .....

L3 SA133TA0 ( 601) gtacctggacctaataaaagggttagtagaaatcagaacttcaattaaaaa
L3 SA133TA6a ( 601) .....

L3 SA133TA0 ( 651) aggtaataaataa
L3 SA133TA6a ( 651) .....
```

Die Operons der L3-Proteine aller Zwischenstufen der *S. aureus* Stämme aus der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA wurden sequenziert um überprüfen zu können, wann die Mutationen erstmalig aufgetreten sind. Der Sequenzvergleich zeigt die Aminosäuresequenz der L27-Proteine im Bereich der beobachteten Mutationen:

```
L3 SA133TA0 ( 151) pgsvglmasdasrvfkgqkmpgrmggntvtlvqnlevvqvdttenkvilvkgn
L3 SA133TA1 ( 151) .....
L3 SA133TA2 ( 151) .....
L3 SA133TA3 ( 151) .....
L3 SA133TA4 ( 151) .....
L3 SA133TA5 ( 151) .....
L3 SA133TA6 ( 151) .....
L3 SA133TA6a ( 151) .r.....a.....
```

Die beiden Mutationen waren bei den untersuchten Zwischenstufen der TAN-1057-resistenzreihen SA133TA nicht zu beobachten. Bis zum letzten Stamm der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA6 entsprach die Aminosäuresequenz der des Ausgangsstammes der Resistenzentwicklung SA133TA0.

Die Mutationen traten erst während der sechsmaligen Überimpfung des Stammes SA133TA6 in TAN1057-freiem FKS-Medium auf. Um überprüfen zu können, ob die gefundenen Mutationen des ribosomalen Proteins L3 in anderen Resistenzentwicklungen wiederholt auftraten, wurde das L3-Operon aus den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen SA4220TA6 und SA4220TB6 sequenziert und mit den L3-Sequenzen der Stämme SA133TA0 und SA133TA6a verglichen:

```
L3 SA133TA0 ( 151) pgsvglmasdasrvfkgqkmpgrmggntvtlvqnlevvqvdttenkvilvkgn
L3 SA133TA6a ( 151) .r.....a.....
L3 SA4220TA6 ( 151) .....
L3 SA4220TB6 ( 151) .....
100
```

Die mutante Aminosäuresequenz des Proteins L3 aus *S. aureus* SA133TA6a konnten in den TAN1057-resistenten Stämmen der unabhängigen Resistenzentwicklung SA4220TA6 und SA4220TB6 nicht erneut beobachtet werden.

4.9.2.4.1 Phylogenetische Untersuchung des ribosomalen Proteins L3

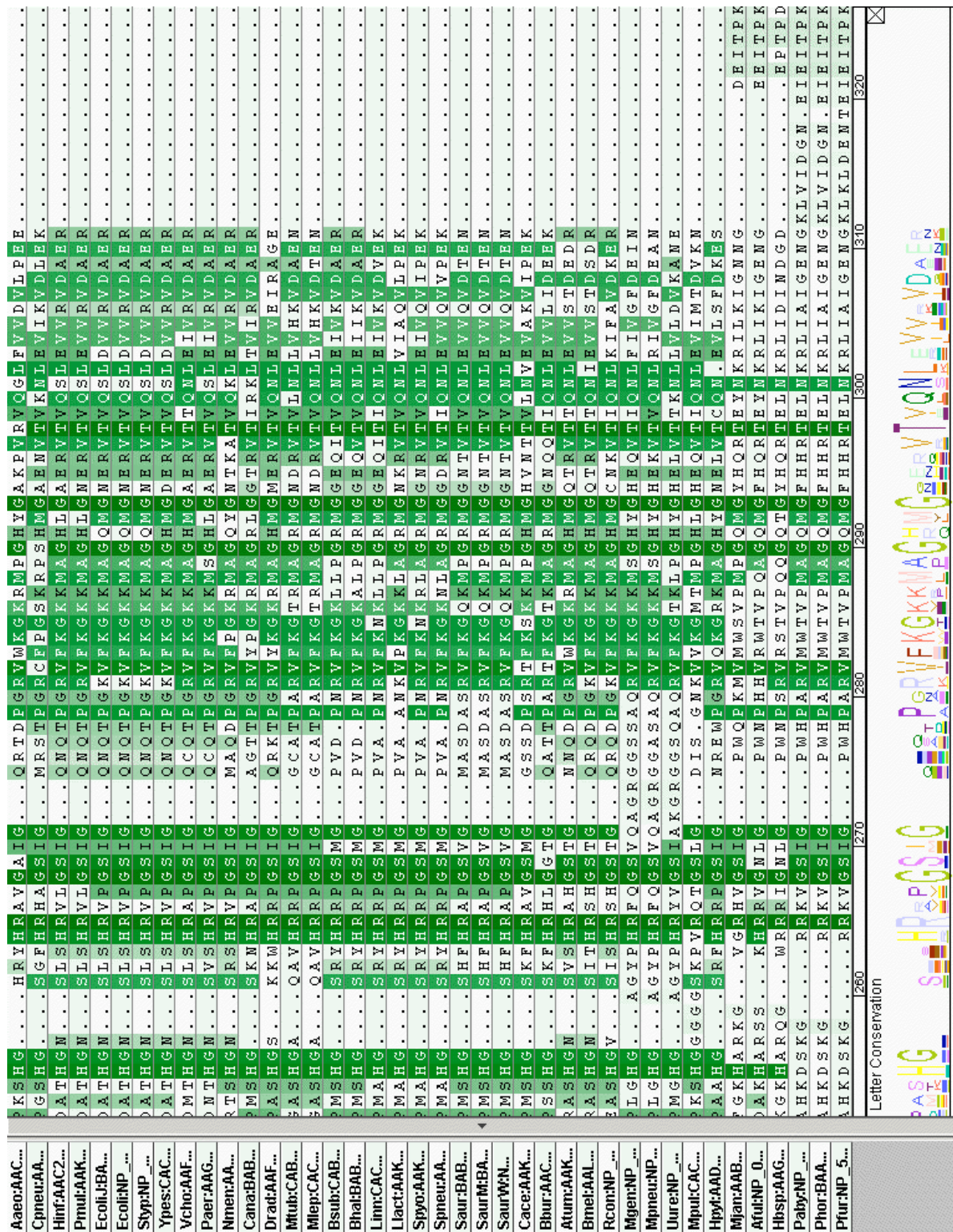


Abbildung 24: Phylogenetischer Vergleich der L3-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei *S. aureus* SA133TA6a gefundenen Mutationen. Verwendete Organismen: siehe Kapitel 3.5.

Die Aminosäuresubstitution G152R des L3-Proteins aus *S. aureus* SA133TA6a befindet sich in der Grafik der phylogenetischen Analyse an Position 268. Das ribosomale L3-Protein aller für den Vergleich verwendeten Spezies zeigt an dieser Position invariabel ein Glycin an.

Die zweite Mutation T179A im ribosomalen L3-Proteins aus *S. aureus* SA133TA6a ist im phylogenetischen Vergleich an der Position 298 verzeichnet. Die auch beim wildtypischen L3-Protein SA133TA0 an dieser Position vorkommende Aminosäure Threonin ist extrem hoch konserviert. Der einzige Organismus des phylogenetischen Vergleichs, bei dem an dieser Position kein Threonin vorkommt ist *Aquifex aeolicus*. *Aquifex* besitzt an dieser Position die Aminosäure Arginin.

4.9.2.5 Das ribosomale Protein L2

Die Sequenzierung des rplB Operons für das ribosomale Protein L2 aus dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a zeigte die Deletion eines Basentriplets im offenen Leseraster des rplB Operons an Position 697-699. Der Vergleich zum Ausgangsstamm SA133TA0 sowie den Sequenzen der Stämme *S. aureus* Mu50, MW2 und N315 verdeutlicht dies:

```

L2 SA133TA0 ( 1) atggctattaaaaagtataagccaataacaaatggtcgtcgtaatatgac
L2 SA133TA6a ( 1) .....
L2 Mu50 ( 1) .....
L2 N315 ( 1) .....
L2 MW2 ( 1) .....

L2 SA133TA0 ( 51) ttcgtagatttcgcgagaaatcacgaaaactacacctgaaaagtcattat
L2 SA133TA6a ( 51) .....
L2 Mu50 ( 51) .....
L2 N315 ( 51) .....
L2 MW2 ( 51) .....

L2 SA133TA0 ( 101) taaaaccgctaccgaaaaaagcgggacgtaacaaccaaggtaaattgact
L2 SA133TA6a ( 101) .....
L2 Mu50 ( 101) .....
L2 N315 ( 101) .....
L2 MW2 ( 101) .....

L2 SA133TA0 ( 151) gtaagacaccatgggtgggtggacacaaacgtcaataccgtgttatcgattt
L2 SA133TA6a ( 151) .....
L2 Mu50 ( 151) .....
L2 N315 ( 151) .....
L2 MW2 ( 151) .....

```

Ergebnisse

L2 SA133TA0	(201)	caaacgtaacaaagatgggatcaatgcaaaaagttgattctattcaatatg
L2 SA133TA6a	(201)
L2 Mu50	(201)
L2 N315	(201)
L2 MW2	(201)
L2 SA133TA0	(251)	atccaaaccgctcagcaaacatcgctttagttgtatatgcagacggtgaa
L2 SA133TA6a	(251)
L2 Mu50	(251)
L2 N315	(251)
L2 MW2	(251)
L2 SA133TA0	(301)	aaacgatatatcattgctcctaaaggattagaagtaggtcaaactcgttga
L2 SA133TA6a	(301)
L2 Mu50	(301)
L2 N315	(301)
L2 MW2	(301)
L2 SA133TA0	(351)	aagtgggctgaagctgacatcaaagttggtaacgcattaccattacaaa
L2 SA133TA6a	(351)
L2 Mu50	(351)
L2 N315	(351)
L2 MW2	(351)
L2 SA133TA0	(401)	acattccagttggtacagtagtacacaacatcgagcttaaacctggtaaa
L2 SA133TA6a	(401)
L2 Mu50	(401)
L2 N315	(401)
L2 MW2	(401)
L2 SA133TA0	(451)	ggaggacaaaatcgctcgctcagctgggcaagtgctcaagtacttggtaa
L2 SA133TA6a	(451)
L2 Mu50	(451)
L2 N315	(451)
L2 MW2	(451)
L2 SA133TA0	(501)	agaaggtaaatacgtattaatcagattaagatctggggaagttcgtatga
L2 SA133TA6a	(501)
L2 Mu50	(501)
L2 N315	(501)
L2 MW2	(501)
L2 SA133TA0	(551)	tcttatctacttgccgtgctacaatcgggcaagttggtaacctacaacac
L2 SA133TA6a	(551)
L2 Mu50	(551)
L2 N315	(551)
L2 MW2	(551)

```

L2 SA133TA0 ( 601) gaattagttaacgttggtaaagccggacggttcaagatggaaaggtatccg
L2 SA133TA6a ( 601) .....
L2 Mu50 ( 601) .....
L2 N315 ( 601) .....
L2 MW2 ( 601) .....

L2 SA133TA0 ( 651) tccaacagttcgtggttctgtaatgaaccctaacgatcacccacacgggtg
L2 SA133TA6a ( 651) .....
L2 Mu50 ( 651) .....
L2 N315 ( 651) .....
L2 MW2 ( 651) .....

L2 SA133TA0 ( 701) gtggtgaaggcgtgctcctatcggtagaccatctccaatgtcaccatgg
L2 SA133TA6a ( 698) .....
L2 Mu50 ( 701) .....
L2 N315 ( 701) .....
L2 MW2 ( 701) .....

L2 SA133TA0 ( 751) ggtaaacctacgcttggtaaagaaaactcgtcgtggtaaaaaatcatcaga
L2 SA133TA6a ( 748) .....
L2 Mu50 ( 751) .....
L2 N315 ( 751) .....
L2 MW2 ( 751) .....

L2 SA133TA0 ( 801) caaacttatcgttcgtggacgtaagaaaaataa
L2 SA133TA6a ( 798) .....
L2 Mu50 ( 801) .....
L2 N315 ( 801) .....
L2 MW2 ( 801) .....

```

Die Deletion der drei Basen im offenen Leseraster des rplB Gens für das ribosomale L2-Protein resultierte in der Deletion der entsprechenden Aminosäure in der Proteinsequenz. Das Protein L2 zeigte in allen TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stämmen die Aminosäuresequenz 232-GGG-236, im TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a hingegen die verkürzte Sequenz 232-GG-235:

```

L2 SA133TA0 ( 1) maikkykpitngrrnmtsldfaeitkttpeksllkplpkagrnnqgklt
L2 SA133TA6a ( 1) .....
L2 Mu50 ( 1) .....
L2 N315 ( 1) .....
L2 MW2 ( 1) .....

```

Ergebnisse

L2 SA133TA0	(51)	vrhhggghkrqyrvidfkrnkdginakvdsiqydpnrnsanialvvyadge
L2 SA133TA6a	(51)
L2 Mu50	(51)
L2 N315	(51)
L2 MW2	(51)
L2 SA133TA0	(101)	kryiiapkglevgqivesgaeadikvgnalplqnipvgtvvhnielkpgk
L2 SA133TA6a	(101)
L2 Mu50	(101)
L2 N315	(101)
L2 MW2	(101)
L2 SA133TA0	(151)	ggqiarsagasaqvlgkegkyvlirlrsgevrmlstcratigqvgnlqh
L2 SA133TA6a	(151)
L2 Mu50	(151)
L2 N315	(151)
L2 MW2	(151)
L2 SA133TA0	(201)	elvnvgkagrswkgirptvrgsvmnpndhphgggegrapigrpspsmpw
L2 SA133TA6a	(201)
L2 Mu50	(201)
L2 N315	(201)
L2 MW2	(201)
L2 SA133TA0	(251)	gkptlgkktrrgkkssdklivrgrkkk
L2 SA133TA6a	(250)
L2 Mu50	(251)
L2 N315	(251)
L2 MW2	(251)

Die Sequenzierung der rplB Operons aus den intermediär resistenten *S. aureus* Stämmen SA133TA1 bis SA133TA6 ergab, dass die Glycindeletion an Position 233-235 des ribosomalen Proteins L2 sehr früh in der Resistenzentwicklung gegen TAN1057 eingesetzt hat. Bereits an Tag 3 der Resistenzentwicklung war die Glycindeletion vorhanden:

L2 SA133TA0	(201)	elvnvgkagrswkgirptvrgsvmnpndhphgggegrapigrpspsmpw
L2 SA133TA1	(201)
L2 SA133TA2	(201)
L2 SA133TA3	(201)
L2 SA133TA4	(201)
L2 SA133TA5	(201)
L2 SA133TA6	(201)
L2 SA133TA6a	(201)

Ein Vergleich der Resistenzdaten mit der L2-Sequenz verdeutlicht diese Entwicklung:

Stamm	Tag	MHK [$\mu\text{g/ml}$] TAN1057	L2-Glycine an Position 233-235
SA133TA0	0	0,125	3
SA133TA1	1	0,5	3
SA133TA2	2	1	3
SA133TA3	3	2	2
SA133TA4	4	8	2
SA133TA5	5	32	2
SA133TA6	6	>64	2
SA133TA6a		>64	2

Tabelle 29: Das Auftreten der L2-Deletionsmutation im Vergleich zur Entwicklung der TAN1057-Resistenz.

Um zu überprüfen, ob die gefundene Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 auch bei weiteren, unabhängig durchgeführten TAN1057-Resistenzselektionen auftrat, wurden die *rplB*-Operons der *S. aureus* Stämme SA133TB bis SA133TF und SA4220TA bis SA4220TC sequenziert. Die Sequenzierung der *rplB*-Operons ergab, dass alle TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme die Deletion eines der drei Glycine an Position 233-235 zeigten. Das *rplB*-Operon des TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stammes 4220, der zur Selektion der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme SA4220TA, SA4220TB und SA4220TC verwendet wurde, zeigte die wildtypische Sequenz des L2-Proteins mit drei Glycinen:

```

L2 SA133TA0 ( 201) elvnavgkagrswrkgirptvrgsvmnpndhphgggegrapigrpspsmpw
L2 SA133TA6a ( 201) .....
L2 SA133TB6 ( 201) .....
L2 SA133TC6 ( 201) .....
L2 SA133TD6 ( 201) .....
L2 SA133TE6 ( 201) .....
L2 SA133TF6 ( 201) .....
L2 SA4220 ( 201) .....
L2 SA4220TA6 ( 201) .....
L2 SA4220TB6 ( 201) .....
L2 SA4220TC6 ( 201) .....

```

Das *rplB*-Operon der *S. aureus* Stämme S4220CA aus der Chloramphenicol-Resistenzselektion, S4220EA aus der Erythromycin-Resistenzselektion und SA4220 aus der sechstägigen Überimpfung in reinem FKS-Medium ohne Selektionsdruck wurde ebenfalls sequenziert. Die *rplB*-Operons aller drei Stämme wiesen die wildtypische Sequenz ohne die L2-Deletionsmutation der *S. aureus* Stämme aus den TAN1057-Resistenzselektionen auf. Weder die Resistenzentwicklung gegen Chloramphenicol oder Erythromycin noch die sechstägige Kultivierung der *S. aureus* Stämme in reinem FKS-Medium erbrachte den Genotyp der L2-Deletionsmutanten:

```
L2 SA133TA0 ( 201) elvvnvgkagrswrkgirptvrgsvmnpndhphgggegrapigrpspsmpw
L2 SA133TA6a ( 201) .....-.....
L2 SA4220 ( 201) .....
L2 SA4220CA ( 201) .....
L2 SA4220EA ( 201) .....

```

Dies zeigte deutlich, dass die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 nicht durch die mehrtägige Überimpfung in FKS-Medium oder die sonstigen Wachstumsbedingungen hervorgerufen wurde, sondern spezifisch während der TAN1057-Resistenzentwicklung selektioniert wurde. Die wildtypische *rplB*-Sequenz der *S. aureus* Stämme aus den Chloramphenicol- und Erythromycin-Resistenzselektionen unterstrich diesen Befund.

Um zu überprüfen, ob die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 auch in anderen Organismen beobachtet werden konnte, wurde das *rplB*-Operon mittels der in Kapitel 3.3.5 und 3.3.7 benannten PCR-Primer aus dem TAN1057-resistenten *E. coli* Stamm HN818TA6 und dem TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm *E. coli* HN818 amplifiziert. Die PCR-Parameter entsprachen dabei denen für die Amplifikation von *rplB* aus *S. aureus* - mit einer auf 90 s verkürzten Extensionszeit. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die Sequenz des wildtypischen *rplB*-Operons aus *E. coli* HN818 für drei Glycine kodiert. Die DNA- Sequenz des TAN1057-resistenten *E. coli* Stamms zeigte analog zu *S. aureus* die entsprechende Deletionsmutation an Position 697-705 im offenen Leseraster:

```
L2 HN818 ( 1) atggcagttgttaaagttaaaccgacatctccgggtcgtcgccacgtagt
L2 HN818TA6 ( 1) .....

L2 HN818 ( 51) taaagtgggttaaccctgagctgcacaagggcaaaccttttgctccgttgc
L2 HN818TA6 ( 51) .....

```

L2 HN818	(101)	tggaaaaaacagcaaatccggtggcgtacaacaacatggccggtatcacc
L2 HN818TA6	(101)
L2 HN818	(151)	actcgtcatatcggtggggccacaagcaggcttacggtattggtgactt
L2 HN818TA6	(151)
L2 HN818	(201)	caaacgcaacaaagacgggtatcccggcagttggtgaacgtcttgagtacg
L2 HN818TA6	(201)
L2 HN818	(251)	atccgaaccggtccgcgaacatcgcgctgggtctgtacaagacggtgaa
L2 HN818TA6	(251)
L2 HN818	(301)	cgccggtacatcctggcccctaaaggcctgaaagctggcgaccagattca
L2 HN818TA6	(301)
L2 HN818	(351)	gtctggcgttgatgctgcaatcaaaccaggtaaacaccctgccgatgcgca
L2 HN818TA6	(351)
L2 HN818	(401)	acatcccggttggttctactgttcataacgtagaaatgaaaccaggtaaa
L2 HN818TA6	(401)
L2 HN818	(451)	ggcggtcagctggcacggtccgctgggtacttacggtcagatcggtgctcg
L2 HN818TA6	(451)
L2 HN818	(501)	tgatgggtgcttatgtcacccctgcgctctgcggtctgggtgaaatgcgtaaag
L2 HN818TA6	(501)
L2 HN818	(551)	tagaagcagactgccgtgcaactctgggcgaagttggcaatgctgagcat
L2 HN818TA6	(551)
L2 HN818	(601)	atgctgcgcttctgggtaaagcagggtgctgcacgctggcgtgggtgctcg
L2 HN818TA6	(601)
L2 HN818	(651)	tccgaccggttcgcggtaccgcgatgaaccggtagaccaccacatgggtg
L2 HN818TA6	(651) ---.
L2 HN818	(701)	gtggtgaaggcgttaactttggtaagcaccggtaactccgtggggcgtt
L2 HN818TA6	(698)
L2 HN818	(751)	cagaccaaaggtaagaagacccgcagcaacaagcgtactgataaattcat
L2 HN818TA6	(748)
L2 HN818	(801)	cgtacgtcgccgtagcaataa
L2 HN818TA6	(798)

Die Aminosäuresequenz des TAN1057-resistenten *E. coli* Stamms HN818TA6 zeigte analog zu den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen die Deletion eines von drei Glycinen an Position 233-235 des ribosomalen Proteins L2:

```

L2 HN818      (    1) mavvkckptspgrrrhvkvvnpelhkgkpfaplleknsksggrnnngrit
L2 HN818TA6  (    1) .....

L2 HN818      (   51) trhiggghkqayrivdfkrnkdgipavverleydpnrnsanialvlykdge
L2 HN818TA6  (   51) .....

L2 HN818      (  101) rryilapkgglkagdqiqsgvdaaikpgntlpmrnipvgstvhnvemkpgk
L2 HN818TA6  (  101) .....

L2 HN818      (  151) ggqlarsagtyvqivardgayvtlrlrsgemrkveadcratlgevnaeh
L2 HN818TA6  (  151) .....

L2 HN818      (  201) mlrvlgkagaarwrgvrptvrgtamnpvdhphgggegrnfgkhpvtpwgv
L2 HN818TA6  (  201) .....

L2 HN818      (  251) qtkgkktrsnkrtdkfivrrrsk
L2 HN818TA6  (  250) .....
    
```

4.9.2.5.1 Phylogenetische Untersuchung des ribosomalen Proteins L2

Um zu überprüfen, wie hoch konserviert die bei *E. coli* und *S. aureus* von der Deletionsmutation betroffenen drei Glycine sind, wurde eine phylogenetische Untersuchung der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L2 durchgeführt:

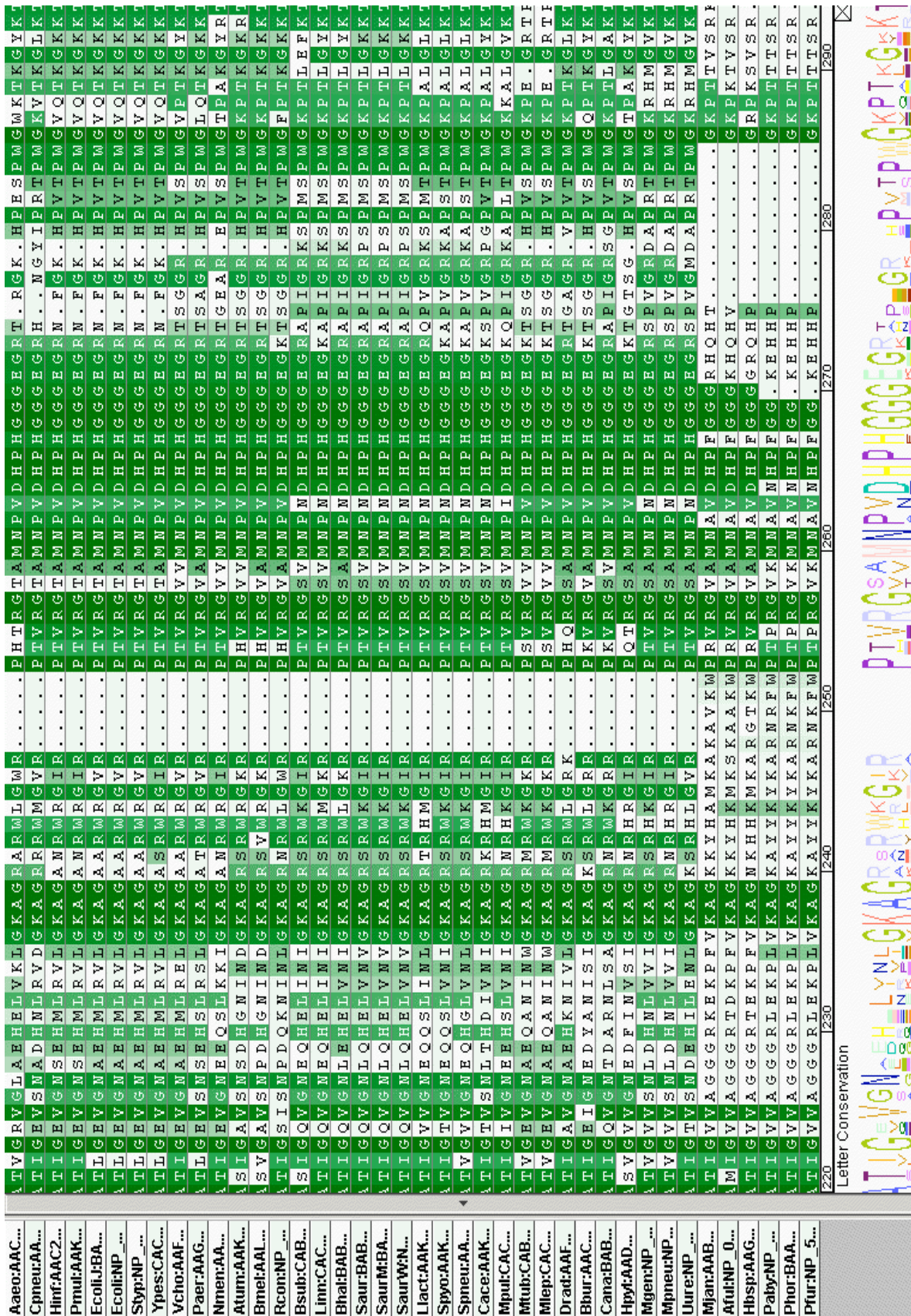


Abbildung 25: Phylogenetischer Vergleich der L2-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei *S. aureus* und *E. coli* gefundenen Deletionsmutation. Verwendete Organismen: siehe Kapitel 3.5.

Die von der Deletionsmutation während der TAN1057-Resistenzentwicklung betroffenen drei Glycine befinden sich in der Grafik der phylogenetischen Analyse an Position 268-270. Die Deletionsmutation lag in einem über das gesamte Spektrum der untersuchten Organismen hoch konservierten Bereich des ribosomalen Proteins L2. 37 der 40 untersuchten Organismen zeigten drei Glycine in diesem Abschnitt des L2-Proteins. Drei der zur Sequenzanalyse verwendeten Organismen zeigten - wie die TAN1057-resistenten Bakterienstämme - zwei Glycine in diesem Bereich des L2-Proteins: die zu den Euryarchaeota zählenden Pyrokokken *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus* und *Pyrococcus horikoshii*. Die Aminosäuresequenz dieser Pyrokokken zeigte zudem die größten Sequenzabweichungen in diesem ansonsten extrem hoch konservierten Proteinbereich.

5 Diskussion

Das Dipeptid-Antibiotikum TAN1057 ist ein aus den gram-negativen Bodenbakterien *Flexibacter sp.* PK-74 und PK-176 isolierbarer Naturstoff mit ausgezeichneter antibakterieller Wirkung gegenüber gram-positiven Staphylokokken, einschließlich methicillinresistenter *S. aureus* Stämme [67].

Aufgrund von *in vitro* Studien ist bekannt, dass TAN1057 die bakterielle Translation nach der Initiationsphase inhibiert [81]. Neben der Inhibierung der Proteinsynthese beeinträchtigt TAN1057 *in vitro* zusätzlich die Bildung der 50S-Untereinheit des Ribosoms [28], ein Mechanismus, der auch bei anderen antibakteriell wirksamen Substanzen beobachtet wurde [26, 27, 29, 31, 32]. TAN1057 hemmt die Peptidyltransferasereaktion, beeinträchtigt jedoch nicht die Bindung von tRNA oder mRNA am Ribosom [17]. Aufgrund der Struktur von TAN1057 wurde angenommen, dass TAN1057 an der 50S-Untereinheit des Ribosoms sowohl mit der 23S-rRNA, als auch mit ribosomalen Proteinen interagieren kann. Die Interaktion mit der ribosomalen RNA würde demnach über den Pyrimidin-Ring von TAN1057 erfolgen, die Bindung an ribosomale Proteine über die Seitenketten von TAN1057 [28].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus von TAN1057 auf *Staphylococcus aureus* untersucht. Den Ausgangspunkt der Untersuchungen stellte die Generierung TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme dar. Die Untersuchung des Resistenzmechanismus von *S. aureus* und die Analyse des Wirkmechanismus erfolgte durch den Vergleich der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme mit den TAN1057-sensitiven Ausgangsstämmen.

In Tiermodellen zeigt TAN1057A/B eine starke antibakterielle Aktivität gegen gram-positive Organismen [19, 20, 47, 81]. Die *in vitro* Aktivität von TAN1057A/B ist stark von den verwendeten Testmedien abhängig und erzielt in foetalem Kälberserum eine sehr gute Wirkung (siehe Kapitel 1.3.2). Alle TAN1057-Resistenzentwicklungen wurden daher in FKS-Medium durchgeführt.

5.1 TAN1057-Resistenzentwicklung in *S. aureus*

Die Selektion TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme zeigte, dass der Verlauf der Resistenzentwicklung reproduzierbar mehrstufig verlief. Die benötigte Konzentration an TAN1057 zur Wachstumsinhibierung der verwendeten *S. aureus* Stämme stieg pro Tag um den Faktor 2 bis 4. Der durch sechsmaliges Überimpfen des TAN1057-resistenten Stammes SA133TA6 in reinem FKS-Medium selektionierte Stamm SA133TA6a zeigte durch seine unveränderte Resistenz gegenüber TAN1057, dass der selektionierte Phänotyp stabil war (Kapitel 4.1). Diese langfristige Stabilität der TAN1057-Resistenz gab Grund zu der Annahme, dass diese durch Mutationen hervorgerufen wurde und keine kurzfristige Adaption auf veränderte Umweltbedingungen darstellte. Sowohl die mehrstufige Zunahme der Antibiotika-Resistenz als auch deren Stabilität wurde in Kontrollexperimenten mit weiteren *S. aureus* Stämmen und für den gram-negativen *E. coli* Stamm HN818 bestätigt.

Die Resistenzentwicklungen von *S. aureus* mit Chloramphenicol und Erythromycin - zwei Substanzen mit ebenfalls translationshemmender Wirkung - haben darüber hinaus gezeigt, dass die Resistenzentwicklung gegenüber diesen Substanzen unter gleichen Bedingungen keinen mehrstufigen, täglichen Anstieg der Antibiotika-Resistenz erzeugte (Kapitel 4.2). Dies zeigt, dass der mehrstufige Anstieg der TAN1057-Resistenz kein methodisches Artefakt darstellt, sondern eine spezifische Eigenschaft der bakteriellen Resistenzentwicklung gegen TAN1057 aufzeigt.

Die tägliche Steigerung der TAN1057-Resistenz betrug in neun unabhängig durchgeführten Resistenzselektionen mit den *S. aureus* Stämmen *S. aureus* 133 und *S. aureus* RN4220 einen Faktor von 2 bis 4. Der *S. aureus* Stamm RN4220 zeigte dabei eine um den Faktor 4 geringere Ausgangsresistenz gegenüber TAN1057. Innerhalb von 6 Tagen wurden bei den Resistenzentwicklungen von *S. aureus* 133 Stämme selektiert, die eine minimale Hemmkonzentration gegenüber TAN1057 von 64 µg/ml bzw. >64 µg/ml zeigten. Die aus *S. aureus* RN4220 selektierten TAN1057-resistenten Stämme erreichten innerhalb des gleichen Zeitraumes eine minimale Hemmkonzentration von 32 µg/ml – 64 µg/ml.

Dies zeigt, dass die tägliche Erhöhung der TAN1057-Resistenz in *S. aureus* stamm-unabhängig und typisch für diese Resistenzentwicklung in allen untersuchten Stämmen ist. Möglicherweise beruhen diese Vorgänge auf gemeinsamen Prinzipien.

Auch die TAN1057-Resistenzentwicklung in *E. coli* HN818 zeigte diesen vielstufigen Resistenzanstieg, wobei die tägliche Steigerungsrate insgesamt jedoch nur einen Faktor ~ 2 betrug. Ein mehrstufiger Anstieg der Antibiotikaresistenz wird auch bei mehreren anderen Substanzen beobachtet:

- Die resistenzvermittelnden Mutationen gegenüber Ciprofloxacin treten in mehreren Stufen auf und beruhen auf der Verringerung der Zellpermeabilität, dem erhöhten Substanz-Efflux und auf resistenzvermittelnde Mutationen des Wirkortes, der bakteriellen Gyrase bzw. Topoisomerase IV [45, 70, 71, 138, 174].
- Auch die Resistenzentwicklung gegenüber den Oxazolidinonen verläuft mehrstufig, beruht jedoch nicht auf dem Zusammenwirken verschiedener Resistenzmechanismen wie im Fall von Ciprofloxacin, sondern auf dem sukzessiven Auftreten von resistenzvermittelnden Mutationen der 23S-rRNA. Die bakterielle Resistenz gegenüber den Oxazolidinonen steigt dabei in Stufen mit der Anzahl der betroffenen rRNA-Kopien an [75, 189].

5.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese der genomischen DNA aus *S. aureus*

Die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) genomischer DNA wird oft zur Klassifizierung der genomischen Diversität innerhalb von Bakterienstämmen eingesetzt [76, 82, 97, 141]. Durch den Vergleich der PFGE-Bandenmuster verschiedener klinischer Isolate kann zudem auf eine gemeinsame Herkunft der Erreger und damit die Art und Geschwindigkeit der Verbreitung dieser Erreger geschlossen werden [49, 153, 191]. Eine durch die Mobilisierung chromosomaler, transponierbarer Elemente verursachte Veränderung des genomischen Restriktionsbandenmusters kann durch eine PFGE-Untersuchung nur dann nachgewiesen werden, wenn die transponierbaren Elemente eine Restriktionsschnittstelle für das verwendete Restriktionsenzym SmaI tragen. Aufgrund der Größe bekannter Transposons in *S. aureus* von 3 bis 7 Kilobasen und in Anbetracht der Tatsache, dass diese transponierbaren Elemente keine SmaI Schnittstelle tragen [39, 126, 151, 152, 187], wäre deren Mobilisierung während der TAN1057-Resistenzselektion lediglich innerhalb kleiner Restriktionsfragmente festzustellen gewesen. Die Mobilisierung eines Transposons schien jedoch auf Grund der reproduzierbar mehrstufigen TAN1057-Resistenzentwicklung in *S. aureus* 133, *S. aureus* 4220 und *E. coli* HN818 unwahrscheinlich. Die PFGE-Analyse der SmaI-geschnittenen chromosomalen DNA von *S. aureus* SA133TA0 - SA133TA6a

zeigte keine feststellbaren Veränderung der Smal-Restriktionsmuster von genomischer DNA der Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a im Trennbereich von 1018,5 Kilobasen bis unter 48,5 Kilobasen. Umlagerungen, Deletionen oder Insertionen genomischer DNA wurden nicht beobachtet und als Grundlage der TAN1057-Resistenzentwicklung nicht in Betracht gezogen.

5.3 Wachstumsgeschwindigkeit TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme

Die Wachstumsgeschwindigkeit der *S. aureus* Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a wurde in FKS-Medium überprüft (Kapitel 4.3). Dieses Medium wurde gewählt, da die Resistenzentwicklung gegen TAN1057 ebenfalls in diesem Medium erfolgte. Die Kontrolle ergab, dass sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme SA133TA1-4 in FKS nicht von der des Wildtyps SA133TA0 unterschied.

Der an Tag 5 der Resistenzreihe isolierte Stamm SA133TA5 zeigte einen verzögerten Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase, gekoppelt mit einer deutlichen Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit. Das Isolat SA133TA6 zeigte eine noch stärkere Ausprägung dieses verringerten Wachstums. Der nach 6-maligem Überimpfen des *S. aureus* Stammes SA133TA6 in TAN1057-freiem Medium erzeugte Stamm SA133TA6a zeigte neben der unveränderten minimalen Hemmkonzentration von TAN1057 auch die gleichen Wachstumsdefizite.

Die Selektion antibiotikaresistenter Bakterien zeigt in den meisten Fällen, dass die selektionierte antibakterielle Resistenz mit deutlichen Wachstumsdefiziten einher geht. Diese Wachstumsdefizite können in der Regel ohne den Verlust der antibakteriellen Resistenz durch weitere Mutationen kompensiert werden [15, 16, 100, 129, 149, 176].

In vivo und *in vitro* Experimente in *Escherichia coli*, HIV, und *Salmonella typhimurium* haben gezeigt, dass im Falle von wachstumsdefizienten Resistenzmutanten in Abwesenheit des entsprechenden Chemotherapeutikums keine Rückmutationen, sondern vermehrt kompensatorische Mutationen bei unveränderter Resistenz auftraten [100].

Im Falle des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a zeigt die Wachstumskurve, dass die sechstägige Kultivierung ohne TAN1057 offensichtlich auch in diesem Fall nicht zu einem TAN1057-sensitiven, revertanten *S. aureus* Stamm geführt hatte. Aufgrund des unveränderten Wachstumsdefizits von *S. aureus*

SA133TA6 zu SA133TA6a wird deutlich, dass innerhalb der sechstägigen Überimpfung keine Kompensation der reduzierten Wachstumsrate erkennbar war.

5.4 Kreuzresistenzen der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme gegen 19 Kontrollsubstanzen

Die Sensitivität des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a und seines sensitiven Ausgangsstammes SA133TA0 gegenüber 19 Kontrollsubstanzen unterschied sich nicht signifikant von einander. Eine Kreuzresistenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber den 19 getesteten Kontrollsubstanzen konnte nicht festgestellt werden:

- Zu den verwendeten Kontrollsubstanzen mit ribosomalem Wirkort gehörten Kanamycin, Neomycin, Streptomycin und Tetrazyklin (30S-Untereinheit des Ribosoms) [12, 77, 119, 146, 177], sowie die an der 50S-Untereinheit wirksamen Substanzen Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin und Linezolid [146]. Bekannte Mutationen oder Modifikationen des Ribosoms - die bei diesen Kontrollantibiotika resistenzvermittelnd sind - konnten daher als Ursache der TAN1057-Resistenz im *S. aureus* Stamm SA133TA6a ausgeschlossen werden.
- Die Sensitivität der Stämme SA133TA0 und SA133TA6a gegenüber Fusidinsäure [78, 121] zeigte keine signifikante Veränderung. Es gab deswegen keine Hinweise auf eine Veränderung in der Bindung des Elongationsfaktors G (EF-G) [78] an das Ribosom.
- Die Chinolone Ciprofloxacin und Moxifloxacin [71] zeigten ebenfalls keine Unterschiede in der Wirkung auf die *S. aureus* Stämme SA133TA0 und SA133TA6a. Bei der Fluorochinolon-Resistenz führt außer einer Mutation am Wirkort, der bakteriellen Gyrase bzw. Topoisomerase IV, auch die erhöhte Produktion von NorA-Effluxpumpen und reduzierte Zellpermeabilität zu einer Erhöhung der Resistenz [45, 70, 138, 174]. Diese Mechanismen können damit als Ursache der erhöhten TAN1057-Resistenz des *S. aureus* Stammes SA133TA6a ebenfalls ausgeschlossen werden.
- In *S. aureus* sind folgende Efflux-Pumpen identifiziert worden, welche die toxische Substanz Ethidiumbromid als Substrat verwenden: TetK, TetL, NorA, QacA, QacB, QacC, QacD, QacG, QacH, Smr, Ebr MrsA, MrsB [90, 102, 108]. Die minimale Hemmkonzentration von Ethidiumbromid für die *S. aureus* Stämme SA133TA0 und SA133TA6a war unverändert. Die TAN1057-

Resistenzentwicklung hat nicht zu einer erkennbaren Veränderung dieser Transportmechanismen geführt.

- Die bekannten Ursachen [158, 168] für die erworbene Resistenz gegenüber Trimethoprim können aufgrund der fehlenden Kreuzresistenz ebenfalls als Ursache der erhöhten TAN1057-Resistenz ausgeschlossen werden. Dazu gehören chromosomale Mutationen, die zur Überexpression der Dihydrofolsäurereduktase führen, sowie Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Dihydrofolsäurereduktase, durch die das Enzym eine geringere Bindungsaffinität gegenüber Trimethoprim erlangt.
- Die Wirkung der Antibiotika Ampicillin, Fosfomycin, Methicillin, Penicillin G, Teicoplanin und Vancomycin beruht auf einem Eingriff in die bakterielle Zellwandsynthese [119, 169, 175]. Aufgrund der fehlenden Kreuzresistenzen gegenüber diesen Substanzen erscheint es unwahrscheinlich, dass gemeinsame Resistenzmechanismen mit der TAN1057-Resistenz vorliegen.

Die fehlende Kreuzresistenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber diesen Substanzen zeigt an, dass die molekulare Grundlage der TAN1057-Resistenz mit keiner dieser bekannten Wirkweisen interferiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte TAN1057-Resistenz des *S. aureus* Stammes SA133TA6a durch keine der für die getesteten Substanzen bekannten Auslöser der bakteriellen Antibiotika-Resistenz erklärt werden kann. Die während der TAN1057-Resistenzselektion aufgetretenen Mutationen, die zur stufenweisen Erhöhung der Resistenz gegenüber TAN1057 geführt haben, zeigen gegenüber anderen Antibiotikaklassen keine Auswirkung auf deren minimale Hemmkonzentration. Dies zeigt, dass der TAN1057-Resistenz ein neuartiger Mechanismus zugrunde liegt und unterstreicht die Bedeutung von TAN1057 als möglicher Ausgangssubstanz für eine therapeutisch nutzbare, neue Antibiotikaklasse.

5.5 Die gekoppelte Transkription/Translation in S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a

Die Analyse der gekoppelten Transkription/Translation mittels S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a zeigte im Vergleich zum mehrstufigen Anstieg der *in vitro* selektionierten TAN1057-Resistenz, dass auf ribosomaler Ebene die Resistenzentwicklung unterschiedlich verlief. Während der ersten vier Tage der Resistenzentwicklung von *S. aureus* gegen TAN1057 änderte sich die Sensitivität der bakteriellen Translation nicht messbar. Erst in S30-Extrakten aus *S. aureus* SA133TA5 vom Tag 5 der Resistenzentwicklung zeigte die gekoppelte Transkription/Translation eine erhöhte Resistenz gegenüber TAN1057. Die IC₅₀-Werte von TAN1057 in S30-Extrakten aus SA133TA6 und SA133TA6a veränderte sich gegenüber den S30-Extrakten aus SA133TA5 nicht mehr wesentlich.

Die S30-Extrakte mit erhöhter TAN1057-Resistenz zeigten gegenüber der verwendeten Kontrollsubstanz Erythromycin keine erkennbare Änderung der IC₅₀-Werte. Die ribosomale Veränderung, die für die erhöhte Resistenz gegenüber TAN1057 verantwortlich war, hatte demnach keine Auswirkung auf die Sensitivität der S30-Extrakte gegenüber Erythromycin. Dies unterstreicht die in Kapitel 5.4 diskutierte Beobachtung, dass bei TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen keine Kreuzresistenzen mit Erythromycin vorliegen.

Die Auftrennung der S30-Extrakte in eine Ribosomenfraktion und den Überstand der zellulären Bestandteile ermöglichte es, die Resistenz der S30-Extrakte aus SA133TA6a gegenüber TAN1057 eindeutig der Ribosomenfraktion zuzuordnen. TAN1057-sensitive Ribosomen wurden durch Zugabe des S150-Überstandes aus dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a nicht resistent gegenüber TAN1057. TAN1057-resistente Ribosomen verloren die Resistenz nicht durch Zugabe eines S150-Extraktes aus dem TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stamm SA133TA0.

Mittels einstufiger Resistenzentwicklungen in *S. aureus* gegen TAN1057 konnten in Experimenten anderer Arbeitsgruppen keine Bakterienstämme gefunden werden, die neben der erhöhten TAN1057-Resistenz auf zellulärer Ebene auch eine Resistenz auf ribosomaler Ebene zeigten [17]. Die Selektion TAN1057-resistenter Bakterienstämme erfolgte in diesen Experimenten durch Ausplattieren von TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stämmen auf Müller-Hinton Agarplatten mit 32 µg/ml TAN1057 und anschließender Inkubation für drei Tage bei 37°C. Die minimale

Hemmkonzentration von TAN1057 auf sensitive *S. aureus* Stämme in Müller-Hinton Medium wurde in diesen Experimenten mit 4 - 8 µg/ml bestimmt. Nach dreitägiger Inkubation wurden demnach vereinzelt Kolonien mit einer um den Faktor 4 bis 8 erhöhten Resistenz gegenüber TAN1057 beobachtet, die nicht ribosomal vermittelt wurde. Die in [17] vorgestellten Daten sind konsistent zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen: für die TAN1057-Resistenzreihe SA133TA wurde gezeigt, dass weder bei einer Steigerung der bakteriellen TAN1057-Resistenz um einen Faktor 4 bis 8, noch nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen *S. aureus* Stämme generiert wurden, die eine Erhöhung der TAN1057-Resistenz auf ribosomaler Ebene zeigten. Die hier vorgelegte Analyse der ribosomal vermittelten Resistenz gegenüber TAN1057 der Resistenzreihe SA133TA zeigt, dass sich die Resistenz erst nach einer mehrtägigen Selektion manifestierte. Sowohl bei den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen SA133TA0 - SA133TA4, als auch bei denen aus [17] wurden somit *S. aureus* Stämme mit erhöhter Resistenz gegen TAN1057 gefunden, ohne dass sich die IC₅₀-Werte dieser Stämme von denen des Wildtyps unterschieden:

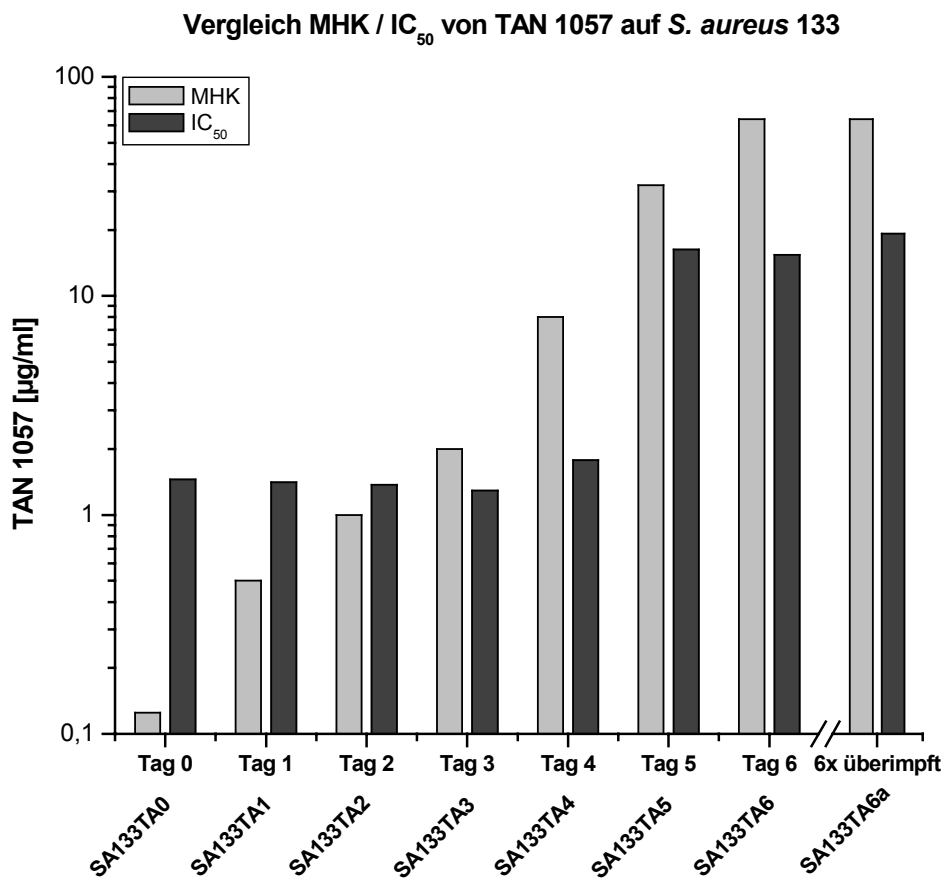


Abbildung 26: Vergleich IC₅₀ und MHK von TAN1057 auf *S. aureus* SA133TA0 bis SA133TA6a.

5.6 Vergleich der während der TAN1057-Resistenzentwicklung selektionierten *S. aureus* Stämme SA133TA0 bis SA133TA6a

Die folgende Tabelle fasst alle Daten der *S. aureus* Stämme der TAN1057-Resistenzreihe SA133TA zusammen:

Stamm	Isoliert [Tag]	MHK [$\mu\text{g/ml}$] TAN1057	PFGE-Analyse genom. DNA	Wachstumsgeschwindigkeit	IC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$] TAN1057
SA133TA0	0	0,125	wildtypisch	wildtypisch	1,5
SA133TA1	1	0,5	wildtypisch	wildtypisch	1,4
SA133TA2	2	1	wildtypisch	wildtypisch	1,4
SA133TA3	3	2	wildtypisch	wildtypisch	1,3
SA133TA4	4	8	wildtypisch	wildtypisch	1,8
SA133TA5	5	32	wildtypisch	reduziert	26,3
SA133TA6	6	>64	wildtypisch	reduziert	15,4
SA133TA6a		>64	wildtypisch	reduziert	19,3

Tabelle 30: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der *S. aureus* Stämme SA133TA0-SA133TA6a.

Die Tabelle zeigt, dass das beobachtete Wachstumsdefizit der TAN1057-resistenten Stämme SA133TA5 - SA133TA6a in reinem FKS-Medium nur bei den Stämmen mit erhöhter TAN1057-Resistenz in den gekoppelten Transkriptions-/Translationsexperimenten zu beobachten ist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der grundlegenden Beobachtung, dass der Erwerb von Antibiotika-Resistenzen meist primär mit einem verringerten Zellwachstum einher geht. Diese Korrelation besteht sowohl bei chromosomalen, rezistenzauslösenden Mutationen, als auch bei plasmidkodierten Resistenzgenen [15].

Die Wachstumsverlangsamung aufgrund der erworbenen Antibiotika-Resistenz kann jedoch in der Folge durch weitere Mutationen kompensiert werden. Dies ermöglicht es den antibiotikaresistenten Bakterien, die Nachteile der rezistenzvermittelnden Mutation auszugleichen ohne die Resistenz verlieren [15, 16, 100, 129, 149, 176]. Aufgrund der unveränderten Wachstumsgeschwindigkeit der *S. aureus* Stämme SA133TA6 und SA133TA6a lassen sich keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten eventueller kompensatorischer Mutationen [15, 100, 129, 149] in *S. aureus* SA133TA6a erkennen.

Falls das verlangsamte Zellwachstum der *in vitro* selektierten TAN1057-resistenten Bakterienstämme auch auf die *in vivo* Resistenzentwicklung übertragbar ist, bedeutet dies aufgrund der Wachstumsnachteile dieser Bakterienstämme eine gute Ausgangsbasis für die Therapie mit TAN1057.

5.7 Mögliche Ursachen der TAN1057-Resistenz

Aufgrund der durchgeführten phänotypischen, biochemischen und PFGE-Untersuchungen der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme ergaben sich mehrere mögliche molekulare Ursachen der TAN1057-Resistenz.

5.7.1 Mutationen der ribosomalen RNA als Ursache der TAN1057-Resistenz

Die Wirkung von TAN1057 beruht auf der Inhibierung der bakteriellen Translation [81]. Wie in [28] gezeigt, beruht die Wirkung von TAN1057 einerseits auf der Hemmung der 50S-Synthese und andererseits auf einer direkten Inhibierung der Proteinsynthese. Der bakterielle Wirkort von TAN1057 ist demnach - wie im Fall der Makrolide - die 50S-Untereinheit des Ribosoms. In beiden Fällen inhibieren die Substanzen die Peptidyltransferase-Reaktion des Ribosoms. Wie in [189] ausgeführt und in [28] auch für TAN1057 in Betracht gezogen, interagieren die meisten der ribosomal wirksamen Antibiotika direkt mit der ribosomalen RNA. Im Falle der Antibiotika mit Wirkung auf die 50S-Untereinheit des Ribosoms erfolgt die Interaktion demnach primär mit der 23S-rRNA. Die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika mit Wirkung auf die 50S-Untereinheit des Ribosoms verläuft daher in den meisten bekannten Fällen über Veränderungen der 23S-rRNA [172].

Eine resistenzvermittelnde Punktmutation der ribosomalen RNA in Organismen mit nur einer Kopie der rRNA, z.B. den Hefemitochondrien, führt zu einer homogenen, antibiotikaresistenten Ribosomenpopulation. Unter Laborbedingungen wurde gezeigt, dass die Substitution der Base A2058 in der ribosomalen RNA von Hefemitochondrien resistenzvermittelnd gegenüber Makroliden wirkt [161]. Die gleichen Beobachtungen wurden bei klinischen Isolaten anderer Organismen mit nur einer Kopie der ribosomalen RNA gemacht, so zum Beispiel bei *Mycoplasma pneumoniae* [50].

Viele Organismen besitzen wie *S. aureus* selbst (5 bis 6 Kopien) mehr als eine Kopie der ribosomalen RNA. Durch eine Punktmutation in einem von mehreren rRNA-Operons entsteht eine heterogene Ribosomenpopulation aus antibiotikaresistenten und -sensitiven Ribosomen. Resistenzvermittelnde Punktmutationen in weiteren Operons der rRNA vergrößern den Anteil der Ribosomen mit der mutanten, antibiotikaresistenten rRNA-Sequenz [156, 173].

In antibiotikaresistenten Organismen mit mehreren Kopien der ribosomalen RNA, so zum Beispiel *Propionibacterium acnes* (3 Kopien des 23S-rRNA Operons) [150] und *Streptococcus pneumoniae* (4 Kopien des 23S-rRNA Operons) [167] wurden sukzessive Mutationen in allen rRNA-Operons gefunden, die eine Makrolidresistenz vermitteln. Die steigende Anzahl der mutanten 23S-rRNA Operons - und damit der steigende Anteil antibiotikaresistenter Ribosomen korreliert in *Streptococcus pneumoniae* direkt mit dem Anstieg der bakteriellen Antibiotika-Resistenz:

- *S. pneumoniae* besitzt vier Kopien des ribosomalen 23S-RNA Operons, wobei die Höhe der Resistenz gegenüber Makroliden und Lincosamiden mit der Anzahl der rRNA-Operons mit der Punktmutation A2059G ansteigt [166].
- Die Punktmutation C2611U der 23S-rRNA vermittelt in *S. pneumoniae* die ribosomale Resistenz gegenüber Erythromycin. Stämme mit dieser Punktmutation auf allen vier rRNA-Kopien zeigten im Gegensatz zu Stämmen mit nur zwei mutanten rRNA-Kopien eine verdoppelte Erythromycintoleranz [25, 167].

Die folgende Grafik veranschaulicht wichtige Mutationen der 23S-rRNA, welche zur Resistenz gegenüber antibakteriell wirksamen Substanzen führen. Die Positionen der aufgelisteten Basen und der resistenzvermittelnden Mutationen entsprechen dabei der *E. coli* Nomenklatur:

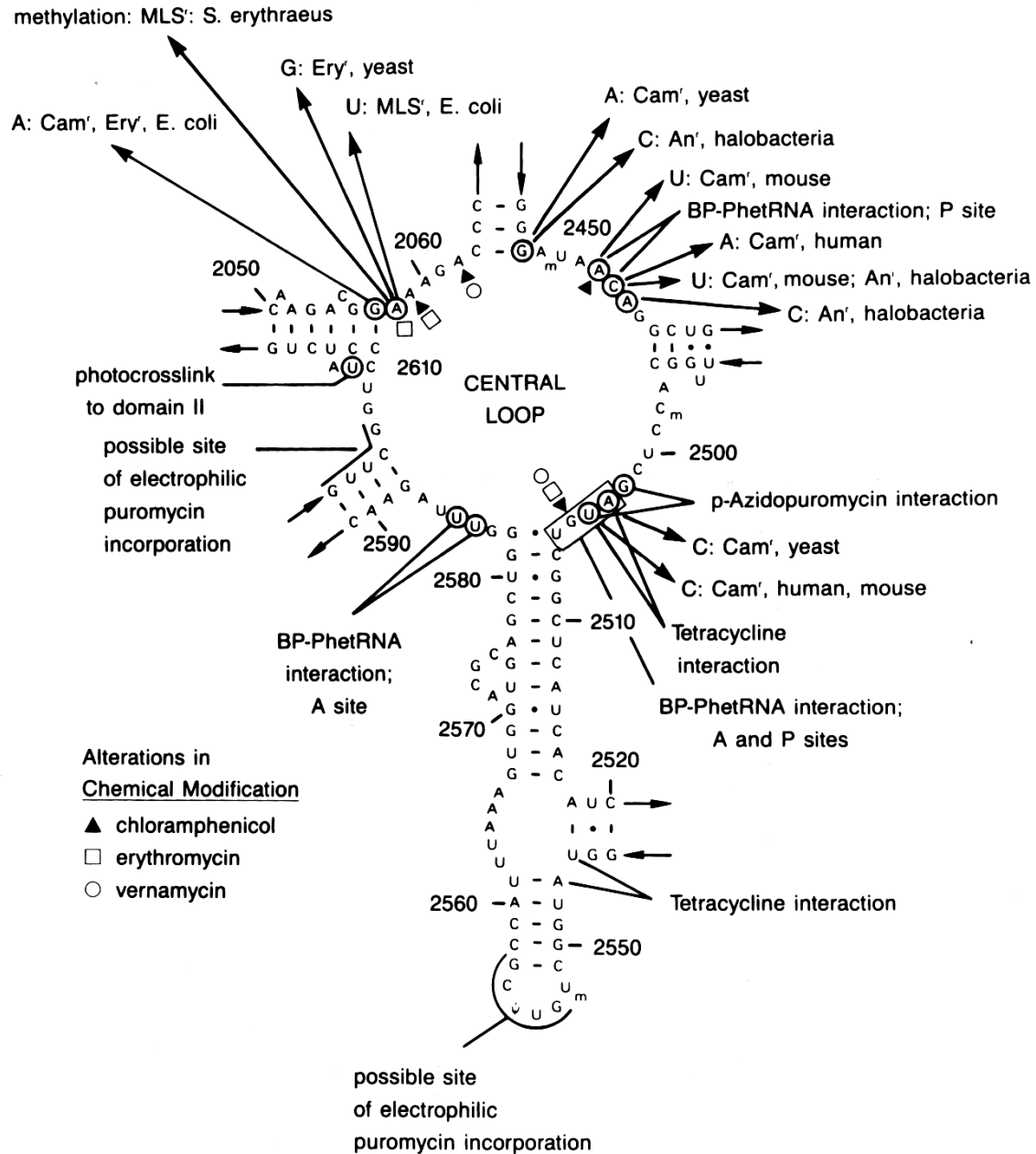


Abbildung 27: Schematische Darstellung der 23S-rRNA Sekundärstruktur im Bereich der Domäne V. Quelle: [34]

Mehrere nacheinander auftretende Punktmutationen in allen 5 Operons der 23S-rRNA der *S. aureus* Stämme aus den TAN1057-Resistenzreihen wurden daher auch für die stufenartige Erhöhung der TAN1057-Resistenz in Betracht gezogen. Daher wurde eine PCR-Strategie entwickelt, um die selektive Amplifikation der 23S-rRNA eines jeweiligen Operons über die flankierende DNA in *S. aureus* zu ermöglichen. Die Sequenzierung der 5 amplifizierten ribosomalen 23S-rRNA Operons konnte jedoch keine derartige sequentielle Mutation in den fünf 23S-rRNA Operons zeigen.

Die beiden gefundenen Mutationen der ribosomalen RNA traten erst im *S. aureus* Stamm SA133TA6a auf. Dieser Stamm entstand durch sechsmaliges Überimpfen des Stammes SA133TA6 in reinem FKS-Medium. Die Mutationen können daher nicht durch die TAN1057-Resistenzentwicklung selektioniert worden sein. Beide Mutationen lagen zudem außerhalb des Peptidyltransferasezentrums der Domäne V der 23S-rRNA. Bekannte 23S-rRNA Mutationen, die gegenüber Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin und Linezolid resistenzvermittelnd wirken, wurden bei der Sequenzierung nicht gefunden. Die in Kapitel 4.4 beschriebenen Kreuzresistenz-Untersuchungen lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf bekannte Mutationen der 23S-rRNA.

Die durch die Mutation U392C verursachte schwache Basenpaarung C=A liegt innerhalb der Helix 18 von Domäne I der 23S ribosomalen RNA. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, befindet sich die Mutation in einem nicht sehr hoch konservierten Bereich, für den in der Literatur eine schwache Basenpaarung jedoch nicht beschrieben ist.

Die Punktmutation C2321U liegt innerhalb der Helix 83 der Domäne V der 23S-rRNA in einem dem Peptidyltransferasezentrum angrenzenden Bereich. Helix 83 und die angrenzende Helix 84 der 23S-rRNA liegen innerhalb eines Bereiches, für den eine räumliche Nähe zum ribosomalen Protein L27 gezeigt werden konnte [184]. Die durch die Mutation C2321U resultierende schwache Basenpaarung U=G in Operon rRNA09 von *S. aureus* SA133TA6a führt möglicherweise zu einer Konformationsänderung dieses Bereiches mit Auswirkung auf die Bindung des ribosomalen Proteins L27.

Aufgrund der vorgestellten Sequenzierungsdaten der ribosomalen 23S-rRNA konnte die Hypothese der sequentiellen 23S-rRNA Mutation als Grundlage der in *S. aureus* selektionierten TAN1057-Resistenz nicht bestätigt werden. Beide gefundenen Mutationen erklären aufgrund ihres späten Auftretens nach der TAN1057-Resistenzentwicklung weder den gemessenen seriellen Anstieg der *in vitro* TAN1057-Resistenz noch den Anstieg des IC₅₀-Wertes für die *S. aureus* Stämme SA133TA5, SA133TA6 und SA133TA6a. Ob es sich bei diesen Mutationen um natürliche Genfluktuationen oder eine Adaption der TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme an ein Medium ohne Selektionsdruck durch TAN1057 handelt, ist nicht zu beantworten. Ein Zusammenhang zwischen den gefundenen Punktmutationen und der ribosomal vermittelten TAN1057-Resistenz erscheint jedoch unwahrscheinlich.

5.7.2 Modifikationen der ribosomalen RNA als Ursache der TAN1057-Resistenz

Durch die *in vitro* Selektion TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme wurden Bakterienstämme selektioniert, die einen sequentiellen Anstieg der bakteriellen Resistenz aufwiesen. Die gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion hat jedoch gezeigt, dass sich die Resistenz gegenüber TAN1057 auf ribosomaler Ebene einstufig manifestierte. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine resistenzvermittelnde, posttranskriptionelle Methylierung der ribosomalen RNA, die in einem Schritt zu einer homogenen, antibiotikaresistenten Ribosomenpopulation führt und für die ribosomale Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika-Klassen beschrieben ist:

- Die Co-Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Typ B Streptograminen wird durch die Methylierung spezifischer Adenin-Basen innerhalb der Domäne V der 23S-rRNA erzielt [157]. Die Adenin-Methylierung erfolgt dabei enzymatisch durch eine Methyltransferase [146, 177].
- Die bakterielle Resistenz gegenüber den an der 30S-Untereinheit des Ribosoms wirksamen Aminoglykosiden wird ebenfalls durch die Methylierung der ribosomalen RNA vermittelt [12].

Aufgrund der fehlenden Kreuzresistenz des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a gegenüber den Makroliden und Aminoglykosiden wurden deren resistenzvermittelnden Methylasen nicht als Auslöser der TAN1057-Resistenz in Betracht gezogen.

Eine weitere Art posttranskriptioneller Modifikationen ribosomaler RNA erfolgt durch Pseudouridinsynthasen [139, 147]. Diese synthetisieren aus Uridin dessen 5-ribosyl-Isomer, Pseudouridin. Substrat der Pseudouridinsynthasen sind dabei 23S-rRNA, 16S-rRNA und tRNA. Die synthetisierten Pseudouridine kommen ausschließlich in RNA-Strukturen vor, deren tertiärer Struktur eine funktionelle Relevanz zukommt [139, 140]. Die enzymatische Modifikation erfolgt durch Öffnen der N-Glycosylbindung, Rotation des enzymgebundenen Uracilrings (C-5 nach N-1) und Neubildung einer C-C Bindung [72]. Pseudouridine sind aufgrund der strukturellen Änderung am Äquivalent der C-5 Position in der Lage, eine zusätzliche Wasserstoff-Brückenbindung einzugehen. Eine postulierte Funktion der Pseudouridine besteht daher in der Stabilisierung spezifischer RNA-Konformationen bzw. Interaktionen [139, 140]. Eine Mutation in einer Pseudouridinsynthase könnte demnach durch die Veränderung der posttranskriptionellen U->Ψ Modifikation einer rRNA oder tRNA zu

einer einstufigen Veränderung der TAN1057-Resistenz auf ribosomaler Ebene führen. Zudem spielen die Pseudouridinsynthasen eine wichtige strukturelle Rolle in der Peptidyltransferase-Reaktion [95, 96].

Da eine Veränderung in der posttranskriptionellen Modifikation der ribosomalen RNA durch Pseudouridinsynthasen nicht mittels der Sequenzierung der 23S-rRNA Operons erkennbar ist, wurde eine Sequenzanalyse der Pseudouridinsynthasen aus *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a durchgeführt.

Die Sequenzierung der Pseudouridinsynthasen ergab eine Punktmutation im chromosomalen *truA*-Operon des TAN1057-resistenten *S. aureus* Stammes SA133TA6a im Vergleich zum TAN1057-sensitiven Ausgangsstamm SA133TA0. Diese Mutation führte zu einer veränderten Aminosäuresequenz der Pseudouridinsynthase TruA. Diese Pseudouridinsynthase katalysiert die Synthese der tRNA-Pseudouridine an der Position 38, 39 und 40 [53, 80]. Die Punktmutation von TruA im TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a führt zum Austausch der Aminosäure Phenylalanin durch Tyrosin an Position 14 der TruA-Aminosäuresequenz (F14Y). Die Sequenzierung der *truA*-Operons aller *S. aureus* Stämme der Resistenzreihe SA133TA ergab, dass die Mutation - wie im Falle des rRNA09-Operons - erst während der sechstägigen Überimpfung des Stammes SA133TA6 in reinem FKS und damit nach der eigentlichen Resistenzentwicklung auftrat. Die genomische Sequenz des *truA*-Operons der anderen TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme SA133TB6, SA133TC6, SA133TD6, SA4220TA6, SA4220TB6 und SA4220TC6 entsprach zudem denen der TAN1057-sensitiven Ausgangsstämme. Auch diese Mutation steht daher nicht in einer ursächlichen Verbindung zur TAN1057-Resistenzentwicklung. Die Möglichkeit einer kompensatorischen Mutation während der sechstägigen seriellen Überimpfung des Stammes SA133TA6 auf FKS-Agarplatten ohne erkennbare phänotypische Auswirkung ist jedoch nicht auszuschließen, zumal die Pseudouridinsynthasen mehr als eine Funktion wahrnehmen:

Durch Untersuchungen an *E. coli* TruB⁻ Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass TruB neben der U55Ψ Synthese bei bakteriellen tRNAs offensichtlich noch weitere Funktionen, z.B. die eines Chaperons besitzt [56]. Zudem liegt die Frameshift-Rate während der bakteriellen Translation bei Deletionsmutanten der tRNA-Pseudouridinsynthasen höher als bei den wildtypischen Ausgangsstämmen [171].

5.7.3 Mutationen der ribosomalen L-Proteine als Ursache der TAN1057-Resistenz

Die Ursache für eine einstufige Erhöhung des IC₅₀-Wertes während der TAN1057-Resistenzentwicklung kann auch in einer Veränderung der ribosomalen Proteine begründet liegen. Die Untersuchung der genomischen DNA von *S. aureus* hat ergeben, dass die meisten ribosomalen L-Proteine im Genom von *S. aureus* nur einmal vorhanden sind. Die einzige Ausnahme der einmaligen chromosomalen Kodierung der ribosomalen L-Proteine stellt das Protein L33 dar. Dieses ist in den *S. aureus* Stämmen Mu50, N315 und MW2 zweimal kodiert. Auch im Stamm *S. aureus* 133 konnten 2 Kopien des ribosomalen Proteins L33 nachgewiesen werden. Mutationen in ribosomalen L-Proteinen als Grundlage einer Antibiotika-Resistenz sind bei anderen, ebenfalls ribosomal wirksamen Antibiotika-Klassen beschrieben worden:

- Mittels der Sequenzanalyse klinischer *Streptococcus pneumoniae* Stämme wurde in [130] gezeigt, dass die Aminosäuresubstitution 69-GTG-71 zu 69-TPS-71 des ribosomalen Proteins L4 resistenzvermittelnd gegenüber Makroliden wirkt. Dieser Mechanismus ist bei den Makrolidantibiotika dabei meist in Verbindung mit einer Modifikation der ribosomalen 23S-rRNA zu beobachten.
- Die *in vitro* Resistenzentwicklung gegen das Makrolidantibiotikum Azithromycin erbrachte ebenfalls die resistenzvermittelnde 69-GTG-71 zu 69-TPS-71 Mutation des ribosomalen L4-Proteins.
- Eine beobachtete Insertion von 6 Aminosäuren in diesem Bereich führte ebenfalls sowohl zur Makrolidresistenz sowie einer verminderten Wachstumsrate [166].
- Weitere Resistenz vermittelnde Veränderungen umfassen die Deletion von 26 Aminosäuren des Proteins L4 an der Position 61 - 86, sowie Deletionen, Punktmutationen und Duplikationen im Bereich der Aminosäure 94 - 100 des Proteins L22 [52, 182].
- Die Makrolide binden am Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms und blockieren dadurch den Eingang des Polypeptid tunnels [48, 163]. Der betroffene Teil des Peptid tunnels wird strukturell von den ribosomalen Proteinen L4 und L22 gebildet. Modifikationen beider L-Proteine können daher zur Resistenz gegenüber den Makroliden führen [22, 48, 116, 163].
- Die Resistenz gegenüber Avilamycin wird durch eine Vielzahl von ribosomalen Veränderungen erreicht: [89, 118, 128]. Avilamycin ist strukturell mit Evernimycin

verwandt. Beide inhibieren die Proteinbiosynthese durch die Bindung an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Die Substanzen interagieren mit der Domäne V der 23S-rRNA. Der Avilamycin-produzierende Organismus *Streptomyces viridochromogenes* erreicht seine Resistenz gegenüber Avilamycin durch die Modifikation der 23S-rRNA mittels zweier rRNA-Methyltransferasen, sowie durch einen ATP-bindenden Transportmechanismus. Aus einem *Enterococcus faecium* Stamm konnte eine 23S-Methyltransferase isoliert werden, die Resistenz gegenüber Avilamycin und Evernimycin vermittelt [110]. Darüber hinaus kann die Resistenz gegen Avilamycin sowohl durch Punktmutationen der 23S-rRNA, als auch durch Mutationen im ribosomalen Protein L16 erzielt werden [1-3, 13, 117].

5.7.3.1 Das ribosomale Protein L3

Die Sequenzanalyse des ribosomalen Proteins L3 zeigte, dass sich der TAN1057-resistente *S. aureus* Stamm SA133TA6a auf chromosomaler Ebene durch vier Punktmutationen vom Ausgangsstamm SA133TA0 unterschied. Zwei der Mutationen führten zu einer veränderten Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L3.

Die Mutationen G152R und T179A konnten wiederum nur in dem TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a nachgewiesen werden. Die Mutationen traten - wie im Fall des rRNA09-Operons der 23S-rRNA und der Pseudouridinsynthase TruA - nach Abschluss der Resistenzentwicklung, während der sechstägigen Kultivierung in reinem FKS-Medium ohne Selektionsdruck auf.

Wie der phylogenetische Vergleich zeigt, ist die von der Mutation G152R betroffene Aminosäure bei allen untersuchten Spezies invariabel mit einem Glycin besetzt.

Auch die zweite Mutation, T179A, ist in einem hoch konservierten Bereich des ribosomalen Proteins L3 lokalisiert. Bis auf *Aquifex aeolicus* und den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a zeigen alle anderen untersuchten Organismen an dieser Position die Aminosäure Threonin. *Aquifex aeolicus* zeigt an Position 179 (*S. aureus* Nomenklatur) die Aminosäure Arginin, bei dem TAN1057-resistenten *S. aureus* Stamm SA133TA6a hingegen ein Alanin. Studien über die Auswirkungen von Punktmutationen in diesen Bereichen des ribosomalen Proteins L3 sind nicht bekannt. Aufgrund des Auftretens der Mutationen nach der eigentlichen TAN1057-Resistenzentwicklung handelt es sich jedoch offensichtlich nicht um resistenzvermittelnde Mutationen.

Das ribosomale Protein L3 weist eine Entfernung zum Peptidyltransferasezentrum von lediglich 18,4 Å auf und ist neben dem Protein L2 elementar für die Funktion des Ribosoms [133]. Die durch die Mutationen G152R und T179A betroffenen, hoch konservierten Aminosäuren, liegen ebenfalls in unmittelbarer Nähe des Peptidyltransferasezentrums. Möglicherweise handelt es sich um kompensatorische Mutationen, deren Auswirkungen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht erkennbar waren. Protein L3 erhöht durch direkte Bindung an die Helicase PcrA die Aktivität dieses Enzyms in *Bacillus stearothermophilus* [162]. Eine Veränderung der PcrA-Bindung durch die beiden beschriebenen Mutationen G152R und T179A wäre in der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion nicht festzustellen gewesen.

5.7.3.2 Das ribosomale Protein L2

Die Sequenzanalyse des ribosomalen Proteins L2 TAN1057-resistenter Bakterienstämme zeigte reproduzierbar die Deletion dreier Basen im offenen Leseraster des rplB-Operons während der Resistenzentwicklung gegen TAN1057. Die Deletion des Basentriplets 696-GGT-700 führt zu einem mutanten ribosomalen L2-Protein mit der Aminosäuredeletion 232-GGG-236 -> 232-GG-235. In allen sechs unabhängigen Resistenzentwicklungen SA133TA bis SA133TF wurden TAN1057-resistente *S. aureus* Stämme selektioniert, deren L2-Protein ebenfalls diese Aminosäuredeletion aufwies. Die Sequenzierung der *S. aureus* 133 Ausgangsstämme zeigte, dass zu Beginn der Resistenzentwicklung immer die wildtypische Aminosäuresequenz 232-GGG-236 des L2-Proteins vorlag. Die Wiederholung der TAN1057-Resistenzentwicklung mit dem *S. aureus* Stamm 4220 zeigte ebenfalls diese Glycindeletion in den TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämmen aller drei unabhängigen Resistenzentwicklungen SA4220TA - SA4220TC. Die wildtypische Aminosäuresequenz 232'GGG'236 des L2-Proteins im Ausgangsstamm *S. aureus* 4220 konnte ebenfalls bestätigt werden.

Die Sequenzierung der rplB-Operons aus den intermediär resistenten *S. aureus* Stämmen SA133TA1 bis SA133TA6 ergab dabei, dass die Glycindeletion des ribosomalen Proteins L2 in einem frühen Stadium der Resistenzentwicklung gegen TAN1057 auftrat.

Erstmalig wurde die Deletion an Tag 3 der Resistenzentwicklung nachgewiesen, 2 Tage bevor sich die erhöhte ribosomale Resistenz im IC₅₀-Wert der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion manifestierte:

Stamm	Tag	MHK [$\mu\text{g/ml}$] TAN1057	L2-Glycine an Position 233-235	IC ₅₀ TAN1057
SA133TA0	0	0,125	3	1,5
SA133TA1	1	0,5	3	1,4
SA133TA2	2	1	3	1,4
SA133TA3	3	2	2	1,3
SA133TA4	4	8	2	1,8
SA133TA5	5	32	2	26,3
SA133TA6	6	>64	2	15,4
SA133TA6a		>64	2	19,3

Tabelle 31: Das Auftreten der L2-Deletionsmutation im Vergleich zur Entwicklung der TAN1057-Resistenz und dem IC₅₀-Wert der gekoppelten Transkription/Translation.

Die Tabelle verdeutlicht, dass die Glycindeletion nicht unmittelbar für die in der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion nachgewiesene Erhöhung der TAN1057-Resistenz verantwortlich sein kann, da die Glycindeletion schon in den *S. aureus* Stämmen SA133TA3 und SA133TA4 vorlag, die ribosomale TAN1057-Resistenz jedoch erst im Stamm SA133TA5 festgestellt werden konnte.

Eine sechstägige Überimpfung von *S. aureus* 133 in reinem FKS-Medium ohne TAN1057 als Selektionsdruck zeigte jedoch bei der Sequenzanalyse des rplB-Operons, dass die Deletionsmutation ohne den Selektionsdruck von TAN1057 nicht auftrat. Um zeigen zu können, dass die beobachtete Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 nicht auf andere experimentelle Rahmenbedingungen zurückzuführen ist, wurde eine Resistenzselektion gegen Chloramphenicol und Erythromycin - zwei weitere antibakterielle Substanzen mit translationshemmender Wirkung - unter ansonsten unveränderten Bedingungen durchgeführt. Beide Resistenzentwicklungen wurden entsprechend nach 6 Tagen beendet und die rplB-Operons der resultierenden *S. aureus* Stämme sequenziert.

Die rplB-Operons dieser *S. aureus* Stämme SA133CA6 und SA133EA6 zeigten sich gegenüber denen der Ausgangsstämme unverändert. Die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 trat demnach nur unter dem Selektionsdruck von TAN1057 auf. Die Sequenzierung des rplB-Operons des TAN1057-sensitiven *E. coli* Stammes HN818 und des daraus selektionierten TAN1057-resistenten Stammes HN818TA6 zeigte zudem, dass die beobachtete Deletionsmutation auch im gram-negativen Stamm *E. coli* HN818 auftrat.

Obwohl die Glycindeletion nicht der direkte Auslöser der erhöhten ribosomalen TAN1057-Resistenz sein kann, zeigt das reproduzierbare Auftreten der Mutation sowohl in *E. coli* als auch in *S. aureus* deren grundlegende Bedeutung für die bakterielle Resistenzentwicklung gegenüber TAN1057. Das frühe Auftreten der Mutation während der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA könnte bedeuten, dass diese Mutation eine notwendige Voraussetzung für die weitere Resistenzentwicklung darstellt, obwohl sie nicht selbst zu einer nachweisbaren Veränderung des Ribosomenapparates führt, die sich in einer erhöhten Resistenz in der gekoppelten Transkriptions-/Translationsreaktion niederschlägt.

Das während der Resistenzentwicklung von TAN1057 reproduzierbar von der 232-GGG-236 -> 232-GG-235 Deletionsmutation betroffene Protein L2 ist das größte ribosomale Protein [131]. Darüber hinaus ist es eines der am besten konservierten Proteine des Ribosomenkomplexes [180, 182]. Als zentraler Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit interagiert das Protein L2 direkt mit der ribosomalen 23S-rRNA [65, 182]. Für *Bacillus stearothermophilus* ist es gelungen, die dreidimensionale Struktur der RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L2 aufzuklären [131]:

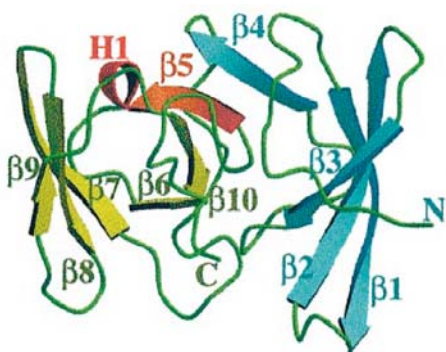


Abbildung 28: Übersicht über die RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L2 aus *Bacillus stearothermophilus*. Quelle: [131]

Die dargestellte zentrale RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L2 besitzt eine β -Struktur mit zwei Domänen annähernd gleicher Größe, die durch eine kurze Helix (H1) miteinander verbunden sind:

Die N-terminale Domäne (R62-P130) besitzt eine fünffache β -Faltblattstruktur, bestehend aus β 1: 75 - 84, β 2: 88 - 96, β 3: 100 - 105, β 4: 114 - 119, β 5: 127 - 131. Die Faltung entspricht einer offenen β -Fass Struktur, wobei die offene Seite auf die C-terminale Domäne gerichtet ist.

Die C-terminale Domäne (L131 - V194) weist ebenfalls eine fünffache β -Faltblattstruktur auf, bestehend aus β 6: 139 - 142, β 7: 161 - 168, β 8: 170 - 175, β 9: 180 - 182, β 10: 188 - 192. Die C-terminale β -Fass Struktur ist durch ein Paar kurzer antiparalleler β -Faltblätter gekennzeichnet.

Mutagenese-Experimente des L2-Operonskonkten zeigen, dass der Austausch mehrerer Aminosäuren die Bindungsaffinität von L2 an die 23S-rRNA herabsetzen. Die wildtypischen Aminosäuren tragen dabei an ihren Seitenketten entweder eine positive Ladung (R68, L70, R86 und R155) oder eine aromatische Struktur. (F66, Y95, Y102) [182]. In beiden Fällen befinden sich die Aminosäuren in der N-terminalen Domäne [131]:

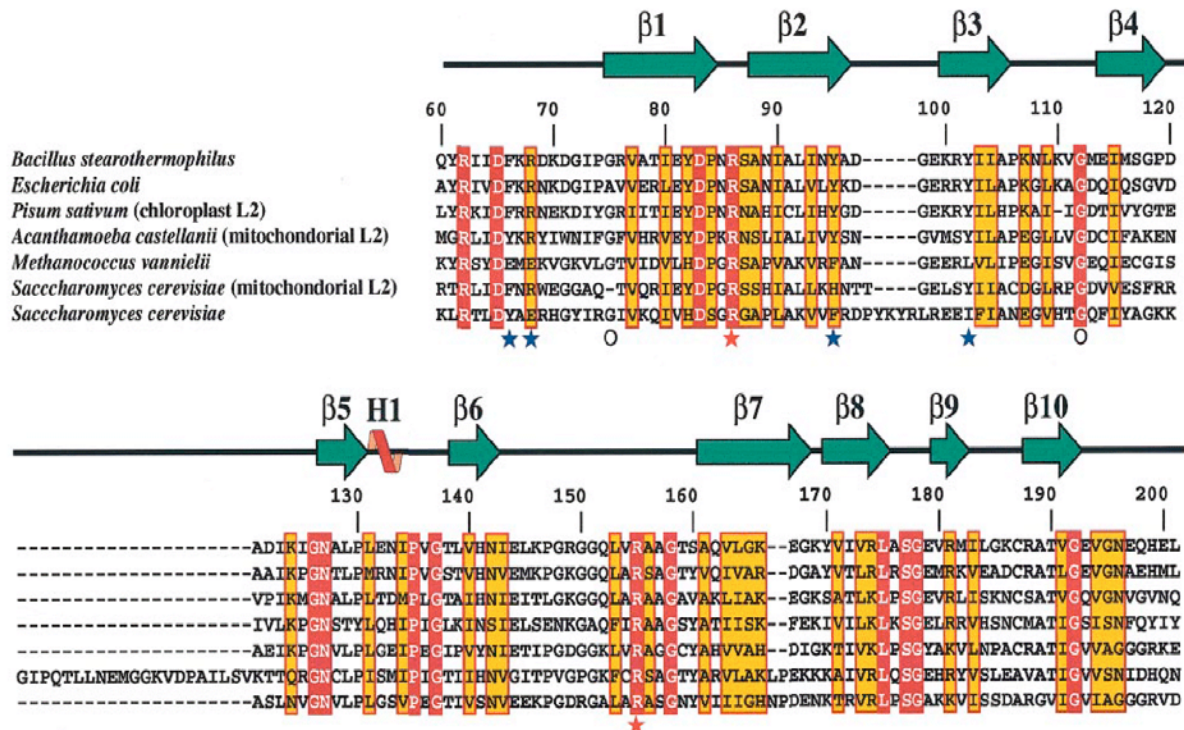


Abbildung 29: Sequenzvergleich der ribosomalen Bindedomäne von L2 mit korrelierender Domänenstruktur. Mutationen, welche die Bindung der ribosomalen RNA beeinträchtigen sind markiert (*). Quelle:[131]

Die RNA-Bindung des ribosomalen Proteins L2 erfolgt dabei an Position 1794 - 1825 der 23S-rRNA innerhalb der Domäne IV (*E. coli* Nomenklatur):

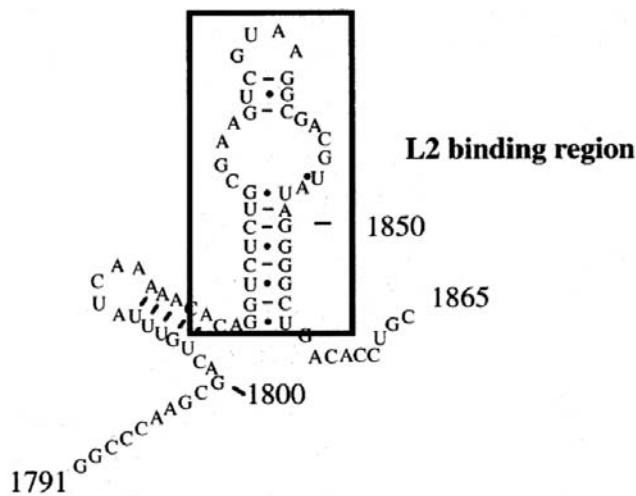


Abbildung 30: Bindungsstelle des Proteins L2 an der ribosomalen 23S-rRNA. Quelle: [61]

Aus den Darstellungen wird ersichtlich, dass die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 der TAN1057-resistenten Bakterienstämmen nicht innerhalb der zentralen RNA-Bindedomäne liegt. Weder der C-Terminus noch der N-Terminus des Proteins L2 befinden sich in räumlicher Nähe der kompakten, zentralen RNA-Bindedomäne des Proteins. Des weiteren wird erkennbar, dass die RNA-Bindung mittels der zentralen L2-Domänen nicht am Peptidyltransferase-Zentrum in der Domäne V der ribosomalen RNA erfolgt, sondern innerhalb der Domäne IV. Die Aufklärung der räumlichen Struktur der großen ribosomalen Untereinheit von *Haloarcula marismortui* [9] hat gezeigt, dass die Bindestelle von Protein L2 und der 23S-rRNA an der ribosomalen Peripherie erfolgt. Sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Arm des Proteins L2 liegen in räumlicher Nähe zum Peptidyltransferase-Zentrum. Experimente mit subribosomalen Komponenten haben gezeigt, dass die Peptidyltransferase-Aktivität *in vitro* auf die Domänen IV und V der ribosomalen 23S-rRNA, sowie die ribosomalen Proteine L3 und L2 reduziert werden kann [51, 83]. Crosslinking- und Footprinting-Experimente haben gezeigt, dass die ribosomalen Proteine L2 und L3 an Segmente der Domänen IV und VI der 23S-rRNA binden. Diese beiden Bereiche flankieren Domäne V, das Peptidyltransferasezentrum.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Lage der L-Proteine, die mit der Domäne V der 23S-rRNA interagieren (A) und die vier ribosomalen Proteine mit der größten räumlichen Nähe zum Peptidyltransferasezentrum (B):

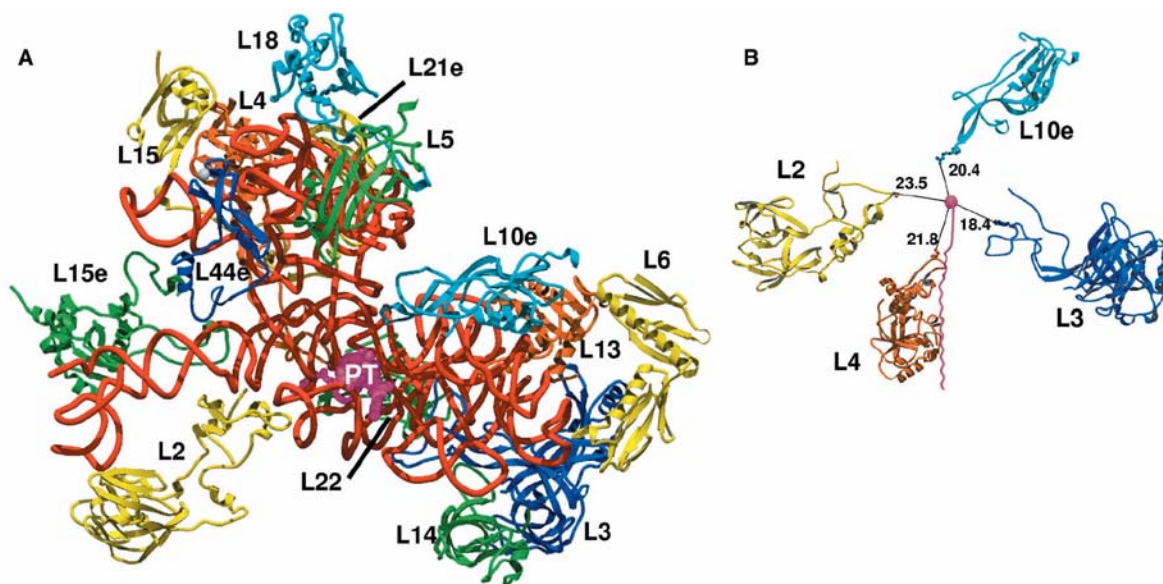


Abbildung 31: Lage der L- Proteine, die mit dem Peptidyltransferasezentrum (PT) der Domäne V der 23S-rRNA interagieren (Abb. A) und die vier ribosomalen Proteine mit der größten räumlichen Nähe zum Peptidyltransferasezentrum (Abb. B). Quelle [133].

Wie auf den Abbildungen ersichtlich, weisen vier ribosomale Proteine große Nähe zum Peptidyltransferasezentrum der 23S-rRNA auf: L2, L3, L4 und L10e. Alle vier Proteine weisen dabei eine ähnliche räumliche Anordnung auf. Die kompakten, zentralen Proteindomänen weisen vom Peptidyltransferasezentrum fort und sind an der Oberfläche des Ribosoms für andere Moleküle zugänglich. Die gestreckten, flexiblen Termini der Proteine zeigen die größte räumliche Annäherung an das Peptidyltransferasezentrum. Auffällig ist, dass die Termini dieser vier Proteine einen Bereich von ca. 20 Å um das Peptidyltransferase-Zentrum freihalten (B).

Mutagenese-Experimente haben gezeigt, dass auch die flexible C-terminale Struktur des ribosomalen Proteins L2 wichtig für die Peptidyltransferase-Aktivität ist [64]. Wie aus phylogenetischen Vergleichen hervorgeht, zeigt die Aminosäuresequenz des Proteins L2 an Position 229 (*E. coli* Nomenklatur) invariabel die Aminosäure Histidin. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Position der hoch konservierten Aminosäure H229 (*E. coli* Nomenklatur, grau) durch einen phylogenetischen Vergleichs der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L2:

Position:	220	230	240		
Aaeo:	..PHTRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRT.RGK.H	PESPWGWKTK	GYKTRRGKKY
Cpneu:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRH..NGYI	P RTPPWGKVTK	GLKTRDNKKS
Hinf:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRHNKRT
Pmul:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRHNKRT
EcoliJ:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRSNKRT
Ecoli:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRSNKRT
Styp:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRSNKRT
Ypes:	..PTVRGTAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRN.FGK.H	PVTPWGVQTK	GKKTRSNKRT
Vcho:	..PTVRGVVM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTSGGR.H	PVSPWGVPTK	GYKTRSNKRT
Paer:	..PTVRGVAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTSAGR.H	PVSPWGLQTK	GKKTRSNKRT
Nmen:	..PTVRGVVM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTGEAR.E	PVSPWGTPAK	GYRTRNNKRT
Atum:	..PHVRGVVM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTSGGR.H	PVTPWKGPTK	GKRTRSNKST
Bmel:	..PHVRGVAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTSGGR.H	PVTPWKGPTK	GKKTRSNKAT
Rcon:	..PHVRGVAM	NPVDH ^H PHGGG	EGKTSGGR.H	PVTPWGFPTK	GKKTRKNKRT
Bsub:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGRAPIGRKS	PMSPWKGPTL	EFKTRKQKNK
Linn:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGKAPIGRKS	PMSPWKGPTL	GYKTRKNNNN
Bhal:	..PTVRGSAM	NPNDH ^H PHGGG	EGRAPIGRKS	PMSPWKGPTL	GYKTRKKNKA
Saur:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGRAPIGRPS	PMSPWKGPTL	GKKTRRGKKS
SaurM:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGRAPIGRPS	PMSPWKGPTL	GKKTRRGKKS
SaurW:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGRAPIGRPS	PMSPWKGPTL	GKKTRRGKKS
Llact:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGRQPVGRKS	PMTPWGKPAL	GLKTRNKKAK
Spyo:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGKAPVGRKA	PSTPWGKPAL	GLKTRNKKAK
Spneu:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGKAPVGRKA	PSTPWGKPAL	GLKTRNKKAK
Cace:	..PTVRGSVM	NPNDH ^H PHGGG	EGKSPVGRPG	PVTPWGKPAL	GYKTRKNKKY
Mpul:	..PTVRGSVM	NPIDH ^H PHGGG	EGKQPIGRKA	PLTPWGGKAL	GVKTRDNKKS
Mtub:	..PSVRGVVM	NPVDH ^H PHGGG	EGKTSGGR.H	PVSPWKGPE.	GRTRNANKSS
Mlep:	..PSVRGVVM	NPVDH ^H PHGGG	EGKTSGGR.H	PVSPWKGPE.	GRTRKPNKSS
Drad:	..PHQRGSAM	NPVDH ^H PHGGG	EGRTGAGR.V	PVTPWKGPTK	GLKTRRKRKT
Bbur:	..PKVRGVAM	NPVDH ^H PHGGG	EGKTSGGR.H	PVSPWQPTK	GYKTRKKKRY
Cana:	..PKVRGSVM	NPVDH ^H PHGGG	EGRAPIGRSG	PVTPWKGPTL	GAKTRKPKKA
Hpyl:	..PQTRGSAM	NPVDH ^H PHGGG	EGKTGTSG.H	PVSPWGTPAK	GYKTRK.KKA
Mgen:	..PTVRGSAM	NPNDH ^H PHGGG	EGRSPVGRDA	P RTPPWGKRHM	GVKTRNMKKH
Mpneu:	..PTVRGSAM	NPNDH ^H PHGGG	EGRSPVGRDA	P RTPPWGKRHM	GVKTRNMKKA
Uure:	..PTVRGSAM	NPNDH ^H PHGGG	EGRSPVGRDA	P RTPPWGKRHM	GVKTRNNKKS
Mjan:	KWPRVRGVAM	NAVDH ^H PHGGG	RHQHT.....GKPTT	VSRKKVPPGR

Position:	220	230	240
Aful:	KWPRVRGVAM	NAVDHHPFGGG	KHQHV.....GKPKT VSR.NAPPGR
Hbsp:	KWPRVRGVAM	NAVDHHPFGGG	GRQHP.....GRPKS VSR.DAAPGR
Paby:	FWPTPRGVKM	NAVNHPFGG.	KEHHP.....GKPTT TSR.RAPPGR
Phor:	FWPTPRGVKM	NAVNHPFGG.	KEHHP.....GKPTT TSR.RAPPGR
Pfur:	FWPTPRGVKM	NAVNHPFGG.	KEHHP.....GKPTT TSR.RAPPGR

Abbildung 32: Phylogenetischer Vergleich der L2-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei *S. aureus* und *E. coli* gefundenen Deletionsmutation. Verwendete Organismen: siehe Tabelle 16a / 16b. Die Nomenklatur entspricht der *E. coli* Sequenz.

Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch des wildtypischen L2-Proteins mit der Aminosäure H229 gegen Q229 in *E. coli* Ribosomen zum völligen Verlust der Peptidyltransferase-Aktivität führt [170]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass weder die Bindung von L2 an die 23S-rRNA, noch die Formation des 70S-Ribosoms durch die H229Q Mutation beeinträchtigt wird [35]. Zudem ist H229 an der Ausbildung der Peptidbrücken während der Elongationsphase der Translation beteiligt [40]. Der Vergleich dieser Daten mit der in Abbildung 28 und 31 dargestellten RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L2 lässt erkennen, dass die H229Q Mutation außerhalb der RNA-Bindedomäne liegt.

Die C-terminale H229Q Mutation liegt vielmehr in räumlicher Nähe zum Peptidyltransferasezentrum und inhibiert dort vollständig die Peptidyltransferase-Aktivität. Studien mit partiellen L2-Proteinen [64] ergaben zudem Hinweise darauf, dass der C-terminale Bereich des ribosomalen Proteins L2 als Stabilisator der Protein-RNA Bindung fungiert.

Bei den TAN1057-resistenten Bakterienstämmen wurde eine Glycindeletion in unmittelbarer Nähe zu H229 gefunden. Dieser für die Elongationsphase der Translation elementare Bereich des Proteins L2 wird während der TAN1057-Resistenzentwicklung demnach reproduzierbar durch eine Glycindeletion verändert. Zwei Aminosäuren trennen H229 von dem durch die Deletion betroffenen Glycin-Triplet. Während die Mutation H229Q zu einem völligen Verlust der Peptidyltransferase-Aktivität führt, scheint die Deletion eines Glycins in unmittelbarer Nähe zu diesem Bereich des ribosomalen Proteins L2 bei der TAN1057-Resistenzentwicklung elementar zu sein.

Die Interaktion von TAN1057 mit ribosomalen Proteinen wurde schon in [28] in Erwägung gezogen. Diese Arbeit zeigt den C-Terminus des ribosomalen Proteins L2 als möglichen Wirkort von TAN1057 auf. Zu diesen Ergebnissen passen die *in vitro* Studien zum Wirkmechanismus von TAN1057 [81], nach denen TAN1057 die bakterielle Translation erst nach der Initiationsphase inhibiert.

5.7.3.3 Varianz der Aminosäuresequenz ribosomaler L-Proteine in *S. aureus*

Der Sequenzvergleich der ribosomalen L-Proteine ergab für den TAN1057-resistenten Stamm SA133TA6a in drei Fällen weitere Unterschiede zur Aminosäuresequenz der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2:

- Im Falle des ribosomalen Proteins L9 zeigten sich für die Aminosäuresequenz der *S. aureus* Stämme SA133TA0 und SA133TA6a an Position 23 die Aminosäure Valin an Stelle des Isoleucins der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2.
- Das ribosomale Protein L19 von *S. aureus* SA133TA0 und SA133TA6a zeigte an der Position 48 die Aminosäure Valin. Die Sequenzen der L19-Proteine aus *S. aureus* Mu50 und N315 zeigten an dieser Position ein Isoleucin, die Sequenz des *S. aureus* Stammes MW2 zeigte an Position 48 des Proteins L19 wie im Falle der Stämme SA133TA0 und SA133TA6a aus der TAN1057-Resistenzreihe ein Valin.
- Die Aminosäuresequenz des L-Proteins 27 der *S. aureus* Stämme SA133TA0 und SA133TA6a stimmte mit der von *S. aureus* N315 und MW2 überein. Die L27-Sequenz des Stammes Mu50 unterschied sich hingegen am N-Terminus signifikant von denen der anderen Stämme.

Die Daten zeigten in allen drei Fällen, dass die gefundenen Unterschiede der Aminosäuresequenzen keine Relevanz für die TAN1057-Resistenz aufwiesen. Die Differenzen bestanden nur gegenüber den Sequenzen der *S. aureus* Stämme Mu50, N315 und MW2, nicht jedoch gegenüber dem TAN1057-sensitiven *S. aureus* Stamm SA133TA0.

Die Analyse der restlichen L-Protein Operons ergab, dass bei den übrigen 29 L-Proteinen keine weiteren Unterschiede in der Aminosäuresequenzen festgestellt werden konnte. Dies zeigte einerseits die hohe Qualität der Sequenzdaten und andererseits den extrem hohen Grad der Konservierung ribosomaler Proteinsequenzen.

6 Zusammenfassende Betrachtung der TAN1057-resistenzvermittelnden Faktoren in *S. aureus*

Die Resistenzentwicklungen von *S. aureus* und *E. coli* gegen TAN1057 haben eine schrittweise Erhöhung der bakteriellen TAN1057-Resistenz über 6 Tage hinweg gezeigt. Die ursprüngliche Hypothese der seriellen Mutation in den 5 Kopien der ribosomalen 23S-RNA konnte nicht bestätigt werden. Die Sequenzierung der 23S-rRNA hat keine Hinweise auf eine Mutation ergeben, die als Auslöser der Resistenz auf RNA-Ebene in Frage kommen würde. Punktmutationen im Operon *rrna09* der 23S-rRNA traten erst nach der Resistenzentwicklung im Stamm SA133TA6a auf. Zudem betrafen sie nur ein Operon der ribosomalen RNA in einem Bereich, der bisher nicht mit der ribosomalen Peptidyltransferase-Aktivität in Verbindung gebracht wurde.

Die IC₅₀-Daten der gekoppelten Transkriptions-/Translationsexperimente für TAN1057 in S30-Extrakten der *S. aureus*-Resistenzreihe SA133TA haben zudem gezeigt, dass sich der stufenartige Anstieg der TAN1057-Resistenz nicht auf ribosomaler Ebene widerspiegelte. Bis einschließlich Tag 4 der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA zeigten die jeweiligen S30-Extrakte der Stämme SA133TA1 bis SA133TA4 eine dem Ausgangsstamm SA133TA0 entsprechende Sensitivität gegenüber TAN1057. Erst am 5. Tag der Resistenzentwicklung war ein sprunghafter Anstieg der TAN1057-Resistenz auf ribosomaler Ebene zu verzeichnen.

Als mögliche Ursache für den sprunghaften Anstieg der ribosomalen TAN1057-Resistenz wurde daraufhin die Möglichkeit einer Modifikation der 23S-rRNA in Betracht gezogen. Die untersuchten Pseudouridinsynthesen zeigten eine Mutation von TruA, die jedoch aufgrund des Auftretens nach der Resistenzentwicklung im Stamm SA133TA6a nicht als Auslöser der ribosomalen Resistenz in Frage kam.

Eine weitere mögliche Erklärung für den sprunghaften Anstieg der ribosomalen TAN1057-Resistenz ist die Mutation der im Genom von *S. aureus* nur einmal kodierten ribosomalen Proteine. Die Mutation des ribosomalen Proteins L3 betraf zwar eine an der Peptidyltransferase-Reaktion unmittelbar beteiligte Komponente, wie im Fall der 23S-rRNA und der Pseudouridinsynthese TruA trat auch diese Mutationen jedoch erst im Stamm SA133TA6a auf und konnte den Anstieg der ribosomalen TAN1057-Resistenz im Stamm SA133TA5 nicht erklären.

Mehrere unabhängige Experimenten mit TAN1057-resistenten Bakterienstämmen legen nahe, dass die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 ursächlich mit der Resistenzentwicklung gegen TAN1057 im Zusammenhang steht. Wenn überhaupt, kann diese Mutation jedoch nicht die alleinige Ursache der beobachteten ribosomalen Resistenz auf T/T-Ebene gegenüber TAN1057 sein, da die L2-Glycindeletion in der TAN1057-Resistenzreihe SA133TA schon vor dem Anstieg der ribosomalen Resistenz auftrat.

Der von der Deletion betroffene Bereich des ribosomalen Proteins L2 befindet sich an dessen C-terminalem Ende. Diese Region des Proteins L2 befindet sich in räumlicher Nähe zum Peptidyltransferase-Zentrum [9]. Die in unmittelbarer Nähe zur Glycindeletion gelegene Aminosäure H229 des ribosomalen Proteins L2 ist für die Peptidyltransferase-Aktivität essentiell. Die Mutation H229Q führt in *E. coli* Ribosomen zum völligen Verlust der Peptidyltransferase-Aktivität, obwohl weder die Bindung des ribosomalen Proteins L2 an die 23S-rRNA, noch die Formation des 70S-Ribosoms beeinträchtigt wird [35], jedoch ist die Aminosäure H229 des ribosomalen Proteins L2 an der Ausbildung der Peptidbrücken während der Elongationsphase der Translation beteiligt [40].

In [28] wurde gezeigt, dass TAN1057 *in vitro* sowohl die Proteinsynthese als auch die Formation der 50S ribosomalen Untereinheit beeinträchtigt. Würde die Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 eine veränderte räumliche Lage des C-Terminus bewirken, so könnte dies die Anlagerung von TAN1057 an die große ribosomale Untereinheit und damit die inhibierende Wirkung der 50S-Formation reduzieren.

Die gekoppelte *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion stellt ein artifizielles System dar, dass die *in vivo* Vorgänge der Translation nur teilweise widerspiegelt. So ist es möglich, dass *in vivo* auftretende Konformationsänderungen des Ribosoms, die zu einer Veränderung der Antibiotikaresistenz führen, in der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion aufgrund von unterschiedlichen Ionenkonzentrationen oder der reduzierten Translationsrate nicht beobachtet werden könnten. Zudem erfolgt während der die gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion nur die einmalige Translation einer mRNA. Das nach der Translation *in vivo* erfolgende Ribosomen-Recycling findet in der *in vitro* Reaktion nicht statt, ebenso wenig wie die Polysomenbildung.

Eine Auswirkung der Glycindeletion auf diese Aspekte der Translation könnte somit *in vivo* einen Selektionsvorteil während der Resistenzentwicklung gegenüber TAN1057 darstellen, in der gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion jedoch nicht zu beobachten sein.

Aufgrund der Komplexität des Ribosoms und seiner dynamischen Struktur ist es darüber hinaus schwierig, alle an der Translation beteiligten Komponenten zu identifizieren und zu untersuchen. So besitzt das von der Glycindeletion betroffene ribosomale Protein L2 neben seiner zentralen RNA-Bindedomäne und den in der Nähe des Peptidyltransferasezentrum liegenden Termini mindestens eine weitere Bindedomäne. Protein L2 ist an der Bindung der 5S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt. Diese Bindung erfolgt im Bereich der Nukleotide 1-69 der 5S-rRNA und befindet sich damit in unmittelbarer Nähe zu den ebenfalls an die 5S-rRNA bindenden Proteinen L5, L18, sowie dem Hitzeschock-Protein HSP70

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die bakterielle Resistenz gegenüber der ribosomal wirksamen Substanz TAN1057 sowohl ribosomale als auch nicht ribosomale Ursachen hat. Die *in vitro* selektionierte Resistenz von *S. aureus* gegenüber TAN1057 hat sich bei der Resistenzreihe SA133TA von 0,125 µg/ml beim Ausgangsstamm SA133TA0 innerhalb von 4 Tagen auf 8 µg/ml beim Stamm SA133TA4 erhöht, ohne sich in einer Steigerung des IC₅₀-Wertes von TAN1057 auf ribosomaler Ebene zu manifestieren. Für den Anstieg der TAN1057-Resistenz gegenüber den *S. aureus* Stämmen SA133TA0 bis SA133TA4 um den Faktor 64 müssen daher andere Gründe als die Mutation bzw. Modifikation ribosomaler Komponenten angenommen werden.

Eine Hypothese für die Erhöhung der bakteriellen TAN1057-Resistenz ohne unmittelbare stufenartige Steigerung der ribosomalen Resistenz ist die veränderte Aufnahme bzw. ein zellulärer Efflux der Substanz. Die Ursache der guten *in vitro* Wirkung von TAN1057 gegenüber *E. coli* HN818 (AcrAB⁻) in diesem Stamm ist der Defekt des AcrAB Membrantransporters, der für den Efflux verschiedener Antibiotika verantwortlich ist (MDR-Typ). Dies zeigt einerseits die grundsätzliche Sensitivität gram-negativer *E. coli* Stämme gegenüber TAN1057, andererseits die prinzipielle Fähigkeit bakterieller Efflux-Pumpen, TAN1057 zu transportieren.

Da der Defekt des AcrAB-Membrantransporters die Sensitivität von *E. coli* gegenüber TAN1057 erhöht, ist es möglich, dass eine Überexpression oder strukturelle Veränderung eines Transporterkomplexes für eine Steigerung der zellulären

TAN1057-Resistenz - ohne Modifikation des Ribosoms - verantwortlich ist. Das offensichtlich für den TAN1057-Efflux in *E. coli* verantwortliche AcrAB-Effluxsystem ist in *S. aureus* nicht vorhanden. Die in *S. aureus* bekannten Efflux-Pumpen konnten aufgrund fehlender Kreuzresistenz gegenüber Ethidiumbromid und Ciprofloxacin nicht als Ursache für einen erhöhten TAN1057 Efflux identifiziert werden. Die Daten zeigen, dass ein erhöhter Efflux von TAN1057 nicht mit den bisher in *S. aureus* identifizierten Efflux-Pumpen in Verbindung gebracht werden kann. Die Möglichkeit, dass ein bisher nicht identifizierter Efflux-Mechanismus an der nicht ribosomalen TAN1057-Resistenz beteiligt ist, kann jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Die Medienabhängigkeit der TAN1057-Wirkung ist bei der frühen, nicht ribosomal vermittelten TAN1057-Resistenz ebenfalls zu berücksichtigen. Die bakterielle Sensitivität gegenüber TAN1057 ist stark vom verwendeten Wachstumsmedium abhängig [17, 81]: die minimale Hemmkonzentration von TAN1057 auf *S. aureus* beträgt in AOAC-Minimalmedium 0,03 µg/ml, in Müller-Hinton Vollmedium hingegen 4 - 8 µg/ml. Keines der verwendeten Kontrollantibiotika zeigt diese extreme Medienabhängigkeit. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von TAN1057 zu einem Dipeptid wurde spekuliert, dass die Aufnahme von TAN1057 aktiv über einen Dipeptid-Transporter erfolgt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zugabe von Dipeptiden zum Minimalmedium - und damit der kompetitiven Aufnahme über die Transporter - die Wirkung von TAN1057 deutlich reduziert [17].

Der bakterielle Peptidtransport ist für die gram-negativen Organismen *E. coli* und *Salmonella typhimurium* detailliert untersucht worden. Diese Organismen besitzen drei genetisch grundlegend zu unterscheidende Permeasen für Di-, Tri- und Oligopeptide - mit teilweise überlappender Substratspezifität [142, 159]:

Die Oligopeptidpermease (Opp) dieser Organismen wird von den 5 Genen oppABCDEF kodiert [68] und dient der Aufnahme von Peptiden aus bis zu 6 Aminosäuren. Tripeptidpermeasen (Tpp) transportieren bevorzugt hydrophobe Tripeptide, in geringerem Maße allerdings auch Dipeptide [6].

Dipeptidpermeasen (Dpp) sind umgekehrt in der Lage, neben dem bevorzugten Substrat der Dipeptide auch (in wesentlich geringerem Ausmaß) Tripeptide zu transportieren [6, 142]. Dpp ist ein membrangebundenes, periplasmatisches Protein. Der Dpp-Locus in *E. coli* besteht aus einem Komplex-Operon für 5 Proteine der ABC-Transporter Familie [6, 143].

Die Loci der Dipeptid-Transporter in *S. aureus* sind hingegen nicht geklärt, jedoch sind hypothetische Proteine mit hoher Homologie zu bekannten Peptidtransportern identifiziert worden.

Die Medienabhängigkeit der TAN1057-Wirkung und die stufenartige Resistenzentwicklung von *S. aureus* gegen TAN1057 ohne sofortige ribosomale Auswirkungen könnten damit erklärt werden, dass die Veränderung von Transportmechanismen an den ersten Schritten der TAN1057-Resistenzentwicklung beteiligt sind, zum Beispiel durch die verminderte Expression eines Dipeptidtransporters oder dessen Veränderung in der Substratspezifität.

Bei steigender TAN1057 Konzentration während der Resistenzentwicklung würde jedoch die intrazelluläre Konzentration von TAN1057 auch aufgrund passiver Diffusionsvorgänge immer weiter ansteigen und zur Selektion von Bakterienstämmen mit einer ribosomal vermittelten TAN1057-Resistenz führen. Die in [17] isolierten TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme wurden durch das einmalige Ausplattieren auf TAN1057-haltigem MH-Agar nach dreitägiger Inkubation selektioniert und zeigten eine um den Faktor 4 bis 8 erhöhte Resistenz ohne messbare Veränderung der ribosomalen Komponenten. Diese Stämme entsprachen damit den in dieser Arbeit untersuchten, frühen Isolaten der TAN1057-Resistenzreihe SA133TA, die bis einschließlich Tag 4 der Resistenzselektion keine Erhöhung der ribosomalen TAN1057-Resistenz zeigten. Diese Ergebnisse lassen sich ebenfalls mit der Hypothese erklären, dass in der Frühphase der TAN1057-Resistenzentwicklung die aktive TAN1057-Aufnahme durch die Modifikation von Peptid-Transportmechanismen inhibiert oder verringert wird.

Die bakterielle Antibiotika-Resistenz lässt sich in vielen Fällen nicht durch einen einzigen Resistenzmechanismus erklären, sondern ist vielmehr als Summe verschiedener resistenzvermittelnder Mutationen und Modifikationen zu sehen. Während der Resistenzentwicklung gegenüber den Fluorochinolonen treten zwar generell Mutationen des antibakteriellen Wirkortes auf (bei gram-negativen Bakterien die Mutationen der zwei Untereinheiten der Gyrase, GyrA und GyrB, bei gram-positiven Bakterien der beiden Untereinheiten der Topoisomerase IV, ParC und ParE), die bakterielle Gesamtresistenz ist jedoch die Summe verschiedener Resistenzmechanismen.

Diese umfassen die erhöhte Produktion von NorA-Effluxpumpen und reduzierte Zellpermeabilität [45, 70, 138, 174]. Die Resistenz gegenüber den Streptograminen erfolgt durch Modifikation des Wirkortes, eine enzymatisch katalysierte Modifikation der Substanz sowie ein Efflux-System [79].

Die Wirkung von TAN1057 beruht auf der Hemmung der bakteriellen Translation. Der Wirkort von TAN1057 ist die 50S-Untereinheit des Ribosoms. Die in dieser Arbeit analysierte bakterielle Resistenz gegenüber TAN1057 scheint ebenfalls die Summe mehrerer Resistenzmechanismen zu sein. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die bakterielle Resistenzentwicklung gegenüber TAN1057 auf Veränderungen des Ribosoms zurückzuführen sind. Vor der Veränderung des Wirkortes von TAN1057 greifen zusätzlich mehrere, nicht ribosomale Resistenzmechanismen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Aarestrup, F. M., and L. B. Jensen.** 2000. Presence of variations in ribosomal protein L16 corresponding to susceptibility of enterococci to oligosaccharides (Avilamycin and evernimicin). *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3425-7.
2. **Adrian, P. V., C. Mendrick, D. Loebenberg, P. McNicholas, K. J. Shaw, K. P. Klugman, R. S. Hare, and T. A. Black.** 2000. Evernimicin (SCH27899) inhibits a novel ribosome target site: analysis of 23S ribosomal DNA mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3101-6.
3. **Adrian, P. V., W. Zhao, T. A. Black, K. J. Shaw, R. S. Hare, and K. P. Klugman.** 2000. Mutations in ribosomal protein L16 conferring reduced susceptibility to evernimicin (SCH27899): implications for mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:732-8.
4. **Aguilar, N., and J. Krüger.** 2002. Towards a Library Synthesis of the Natural Dipeptide Antibiotic TAN 1057 A,B. *Molecules* **7**:469-74.
5. **Alix, J. H.** 1988. Post-translational methylations of ribosomal proteins. *Adv Exp Med Biol* **231**:371-85.
6. **Alves, R. A., and J. W. Payne.** 1980. The number and nature of the peptide-transport systems of *Escherichia coli*: characterization of specific transport mutants. *Biochem Soc Trans* **8**:704-5.
7. **Arnold, R. J., and J. P. Reilly.** 1999. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* **269**:105-12.
8. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**:1819-27.
9. **Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**:905-20.
10. **Baron, S.** 1999. *Medical Microbiology*, 4th Edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston **ISBN 0-9631172-1-1**.

11. **Barrett, J. F.** 2000. Linezolid Pharmacia Corp. *Curr Opin Investig Drugs* **1**:181-7.
12. **Beauclerk, A. A., and E. Cundliffe.** 1987. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol* **193**:661-71.
13. **Belova, L., T. Tenson, L. Xiong, P. M. McNicholas, and A. S. Mankin.** 2001. A novel site of antibiotic action in the ribosome: interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3726-31.
14. **Berger-Bachi, B.** 2002. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* **292**:27-35.
15. **Bjorkman, J., I. Nagaev, O. G. Berg, D. Hughes, and D. I. Andersson.** 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* **287**:1479-82.
16. **Bjorkman, J., P. Samuelsson, D. I. Andersson, and D. Hughes.** 1999. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **31**:53-8.
17. **Boddeker, N., G. Bahador, C. Gibbs, E. Mabery, J. Wolf, L. Xu, and J. Watson.** 2002. Characterization of a novel antibacterial agent that inhibits bacterial translation. *RNA* **8**:1120-8.
18. **Bonnefoy, A., A. M. Girard, C. Agouridas, and J. F. Chantot.** 1997. Ketolides lack inducibility properties of MLS(B) resistance phenotype. *J Antimicrob Chemother* **40**:85-90.
19. **Brands, M., R. Endermann, R. Gahlmann, J. Kruger, and S. Raddatz.** 2003. Dihydropyrimidinones-a new class of anti-Staphylococcal antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:241-5.
20. **Brands, M., R. Endermann, R. Gahlmann, J. Kruger, S. Raddatz, J. Stoltefuss, V. N. Belov, S. Nizamov, V. V. Sokolov, and A. de Meijere.** 2002. Novel antibiotics for the treatment of gram-positive bacterial infections. *J Med Chem* **45**:4246-53.
21. **Bridges, B. A.** 2001. Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:29-39.

22. **Brisson-Noel, A., P. Trieu-Cuot, and P. Courvalin.** 1988. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemother* **22 Suppl B**:13-23.
23. **Bryskier, A.** 2001. Telithromycin--an innovative ketolide antimicrobials. *Jpn J Antibiot* **54 Suppl A**:64-9.
24. **Cannone, J. J., S. Subramanian, M. N. Schnare, J. R. Collett, L. M. D'Souza, Y. Du, B. Feng, N. Lin, L. V. Madabusi, K. M. Muller, N. Pande, Z. Shang, N. Yu, and R. R. Gutell.** 2002. The Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**:2.
25. **Canu, A., B. Malbruny, M. Coquemont, T. A. Davies, P. C. Appelbaum, and R. Leclercq.** 2002. Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:125-31.
26. **Champney, W. S., and R. Burdine.** 1998. Macrolide antibiotic inhibition of translation and 50S ribosomal subunit assembly in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cells. *Microb Drug Resist* **4**:169-74.
27. **Champney, W. S., and M. Miller.** 2002. Linezolid is a specific inhibitor of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Curr Microbiol* **44**:350-6.
28. **Champney, W. S., J. Pelt, and C. L. Tober.** 2001. TAN-1057A: a translational inhibitor with a specific inhibitory effect on 50S ribosomal subunit formation. *Curr Microbiol* **43**:340-5.
29. **Champney, W. S., and C. L. Tober.** 2000. Evernimicin (SCH27899) inhibits both translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1413-7.
30. **Champney, W. S., and C. L. Tober.** 1998. Inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 11 different ketolide antibiotics. *Curr Microbiol* **37**:418-25.
31. **Champney, W. S., and C. L. Tober.** 2000. Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. *Curr Microbiol* **41**:126-35.
32. **Champney, W. S., and C. L. Tober.** 2001. Structure-activity relationships for six ketolide antibiotics. *Curr Microbiol* **42**:203-10.

33. **Chang, C. N., and N. Chang.** 1975. Methylation of the ribosomal proteins in *Escherichia coli*. Nature and stoichiometry of the methylated amino acids in 50S ribosomal proteins. *Biochemistry* **14**:468-77.
34. **Cooperman, B. S., C. J. Weitzmann, and C. L. Fernández.** 1990. The Ribosome: structure, function and evolution. American Society for Microbiology, Washington D.C.:498.
35. **Cooperman, B. S., T. Wooten, D. P. Romero, and R. R. Traut.** 1995. Histidine 229 in protein L2 is apparently essential for 50S peptidyl transferase activity. *Biochem Cell Biol* **73**:1087-94.
36. **Davies, J. E.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* **207**:15-27; discussion 27-35.
37. **Davis, D. R.** 1995. Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic Acids Res* **23**:5020-6.
38. **Del Campo, M., Y. Kaya, and J. Ofengand.** 2001. Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *Rna* **7**:1603-15.
39. **Derbise, A., K. G. Dyke, and N. el Solh.** 1996. Characterization of a *Staphylococcus aureus* transposon, Tn5405, located within Tn5404 and carrying the aminoglycoside resistance genes, aphA-3 and aadE. *Plasmid* **35**:174-88.
40. **Diedrich, G., C. M. Spahn, U. Stelzl, M. A. Schafer, T. Wooten, D. E. Bochkariov, B. S. Cooperman, R. R. Traut, and K. H. Nierhaus.** 2000. Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *Embo J* **19**:5241-50.
41. **Douthwaite, S., and W. S. Champney.** 2001. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J Antimicrob Chemother* **48 Suppl T1**:1-8.
42. **Egebjerg, J., N. Larsen, and R. A. Garrett.** 1990. The Ribosome: structure, function and evolution. American Society for Microbiology, Washington D.C.:172.
43. **Egebjerg, J., N. Larsen, and R. A. Garrett.** 1990. The Ribosome: structure, function and evolution. American Society for Microbiology, Washington D.C.:173.

44. **Ericsson, H. M., and J. C. Sherris.** 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* **217**:Suppl 217:1+.
45. **Everett, M. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and L. J. Piddock.** 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2380-6.
46. **Foster, P. L.** 1993. Adaptive mutation: the uses of adversity. *Annu Rev Microbiol* **47**:467-504.
47. **Funabashi, Y., S. Tsubotani, K. Koyama, N. Katayama, and S. Harada.** 1993. A New Anti-MRSA Dipeptide, TAN-1057 A. *Tetrahedron* **49**:13-28.
48. **Gabashvili, I. S., S. T. Gregory, M. Valle, R. Grassucci, M. Worbs, M. C. Wahl, A. E. Dahlberg, and J. Frank.** 2001. The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol Cell* **8**:181-8.
49. **Galdbart, J. O., A. Morvan, and N. El Solh.** 2000. Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains susceptible to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997. *J Clin Microbiol* **38**:185-90.
50. **Gobel, U., G. H. Butler, and E. J. Stanbridge.** 1984. Comparative analysis of mycoplasma ribosomal RNA operons. *Isr J Med Sci* **20**:762-4.
51. **Green, R., and H. F. Noller.** 1997. Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**:679-716.
52. **Gregory, S. T., and A. E. Dahlberg.** 1999. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *J Mol Biol* **289**:827-34.
53. **Gu, X., Y. Liu, and D. V. Santi.** 1999. The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14270-5.
54. **Gualerzi, C. O., and C. L. Pon.** 1990. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**:5881-9.
55. **Gutell, R. R., N. Larsen, and C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* **58**:10-26.

56. **Gutgsell, N., N. Englund, L. Niu, Y. Kaya, B. G. Lane, and J. Ofengand.** 2000. Deletion of the *Escherichia coli* pseudouridine synthase gene *truB* blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA in vivo, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells. *Rna* **6**:1870-81.
57. **Hakenbeck, R.** Universität Kaiserslautern, Abt. Mikrobiologie, persönliche Mitteilung.
58. **Hall, R. M.** 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp* **207**:192-202; discussion 202-5.
59. **Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia, and H. W. Stokes.** 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* **870**:68-80.
60. **Hansen, M. A., F. Kirpekar, W. Ritterbusch, and B. Vester.** 2002. Posttranscriptional modifications in the A-loop of 23S rRNAs from selected archaea and eubacteria. *Rna* **8**:202-13.
61. **Harada, N., K. Maemura, N. Yamasaki, and M. Kimura.** 1998. Identification by site-directed mutagenesis of amino acid residues in ribosomal protein L2 that are essential for binding to 23S ribosomal RNA. *Biochim Biophys Acta* **1429**:176-86.
62. **Harms, J., F. Schluenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, and A. Yonath.** 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**:679-88.
63. **Hartz, D., D. S. McPheeters, and L. Gold.** 1989. Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev* **3**:1899-912.
64. **Hayashi, T., M. Tahara, K. Iwasaki, Y. Kouzuma, and M. Kimura.** 2002. Requirement for C-terminal extension to the RNA binding domain for efficient RNA binding by ribosomal protein L2. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:682-4.
65. **Herfurth, E., and B. Wittmann-Liebold.** 1995. Determination of peptide regions exposed at the surface of the bacterial ribosome with antibodies against synthetic peptides. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**:81-90.

-
66. **Heurgue-Hamard, V., S. Champ, A. Engstrom, M. Ehrenberg, and R. H. Buckingham.** 2002. The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *Embo J* **21**:769-78.
 67. **Hideo, O.** 1989. Antibiotics TAN-1057 patent EP 339596.
 68. **Hiles, I. D., M. P. Gallagher, D. J. Jamieson, and C. F. Higgins.** 1987. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **195**:125-42.
 69. **Hof, H., Müller, R.L., Dörries R.** 2000. *Mikrobiologie*. Thieme Verlag:264.
 70. **Hooper, D. C.** 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7**:337-41.
 71. **Hooper, D. C.** 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 1**:S9-S15.
 72. **Huang, L., J. Ku, M. Pookanjanatavip, X. Gu, D. Wang, P. J. Greene, and D. V. Santi.** 1998. Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry* **37**:15951-7.
 73. **Hughes, D., and D. I. Andersson.** 1997. Carbon starvation of *Salmonella typhimurium* does not cause a general increase of mutation rates. *J Bacteriol* **179**:6688-91.
 74. **Hughes, V. M., and N. Datta.** 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* **302**:725-6.
 75. **Hutchinson, D. K.** 2003. Oxazolidinone antibacterial agents: a critical review. *Curr Top Med Chem* **3**:1021-42.
 76. **Ichiyama, S., M. Ohta, K. Shimokata, N. Kato, and J. Takeuchi.** 1991. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **29**:2690-5.
 77. **Jerinic, O., and S. Joseph.** 2000. Conformational changes in the ribosome induced by translational miscoding agents. *J Mol Biol* **304**:707-13.
 78. **Johanson, U., A. Aevarsson, A. Liljas, and D. Hughes.** 1996. The dynamic structure of EF-G studied by fusidic acid resistance and internal revertants. *J Mol Biol* **258**:420-32.

79. **Johnston, N. J., T. A. Mukhtar, and G. D. Wright.** 2002. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* **3**:335-44.
80. **Kammen, H. O., C. C. Marvel, L. Hardy, and E. E. Penhoet.** 1988. Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I. *J Biol Chem* **263**:2255-63.
81. **Katayama, N., S. Fukusumi, Y. Funabashi, T. Iwahi, and H. Ono.** 1993. TAN-1057 A-D, new antibiotics with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **46**:606-13.
82. **Kawalec, M., M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz.** 2000. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdask, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* **38**:3317-22.
83. **Khaitovich, P., A. S. Mankin, R. Green, L. Lancaster, and H. F. Noller.** 1999. Characterization of functionally active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:85-90.
84. **Kim, W. J., and S. C. Park.** 1998. Bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview from Korea. *Yonsei Med J* **39**:488-94.
85. **Kirillov, S., B. T. Porse, B. Vester, P. Woolley, and R. A. Garrett.** 1997. Movement of the 3'-end of tRNA through the peptidyl transferase centre and its inhibition by antibiotics. *FEBS Lett* **406**:223-33.
86. **Kirillov, S. V., J. Wower, S. S. Hixson, and R. A. Zimmermann.** 2002. Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome: cross-linking of the 3' end of tRNA to ribosomal proteins at the P and E sites. *FEBS Lett* **514**:60-6.
87. **Klugman, K. P.** 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* **3**:171-96.
88. **Koch, A. L.** 2000. Penicillin binding proteins, beta-lactams, and lactamases: offensives, attacks, and defensive countermeasures. *Crit Rev Microbiol* **26**:205-20.
89. **Kofoed, C. B., and B. Vester.** 2002. Interaction of avilamycin with ribosomes and resistance caused by mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3339-42.

-
90. **Kohler, T., M. Michea-Hamzhepour, P. Plesiat, A. L. Kahr, and J. C. Pechere.** 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2540-3.
91. **Kowalak, J. A., E. Bruenger, T. Hashizume, J. M. Peltier, J. Ofengand, and J. A. McCloskey.** 1996. Structural characterization of U^{*}-1915 in domain IV from *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA as 3-methylpseudouridine. *Nucleic Acids Res* **24**:688-93.
92. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**:1225-40.
93. **La Teana, A., C. L. Pon, and C. O. Gualerzi.** 1996. Late events in translation initiation. Adjustment of fMet-tRNA in the ribosomal P-site. *J Mol Biol* **256**:667-75.
94. **Lancaster, L., M. C. Kiel, A. Kaji, and H. F. Noller.** 2002. Orientation of ribosome recycling factor in the ribosome from directed hydroxyl radical probing. *Cell* **111**:129-40.
95. **Lane, B. G., J. Ofengand, and M. W. Gray.** 1995. Pseudouridine and O^{2'}-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. *Biochimie* **77**:7-15.
96. **Lane, B. G., J. Ofengand, and M. W. Gray.** 1992. Pseudouridine in the large-subunit (23 S-like) ribosomal RNA. The site of peptidyl transfer in the ribosome? *FEBS Lett* **302**:1-4.
97. **Lelievre, H., G. Lina, M. E. Jones, C. Olive, F. Forey, M. Roussel-Delvallez, M. H. Nicolas-Chanoine, C. M. Bebear, V. Jarlier, A. Andremont, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol* **37**:3452-7.

98. **Leontis, N. B., J. Stombaugh, and E. Westhof.** 2002. Motif prediction in ribosomal RNAs Lessons and prospects for automated motif prediction in homologous RNA molecules. *Biochimie* **84**:961-73.
99. **Leontis, N. B., J. Stombaugh, and E. Westhof.** 2002. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res* **30**:3497-531.
100. **Levin, B. R., V. Perrot, and N. Walker.** 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**:985-97.
101. **Levison, M. E.** 1995. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and postantibiotic effects. *Infect Dis Clin North Am* **9**:483-95.
102. **Levy, S. B.** 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:695-703.
103. **Lin, A. H., R. W. Murray, T. J. Vidmar, and K. R. Marotti.** 1997. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2127-31.
104. **Livermore, D. M.** 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* **16 Suppl 1**:S3-10.
105. **Livermore, D. M.** 1990. Antibiotic uptake and transport by bacteria. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**:15-22.
106. **Livermore, D. M.** 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* **36**:S11-23.
107. **Livermore, D. M.** 2000. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med* **26 Suppl 1**:S14-21.
108. **Lomovskaya, O., and W. J. Watkins.** 2001. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr Med Chem* **8**:1699-711.
109. **Lyon, B. R., and R. Skurray.** 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* **51**:88-134.
110. **Mann, P. A., L. Xiong, A. S. Mankin, A. S. Chau, C. A. Mendrick, D. J. Najarian, C. A. Cramer, D. Loebenberg, E. Coates, N. J. Murgolo, F. M. Aarestrup, R. V. Goering, T. A. Black, R. S. Hare, and P. M. McNicholas.** 2001. EmtA, a rRNA methyltransferase conferring high-level evernimicin resistance. *Mol Microbiol* **41**:1349-56.

-
111. **Martinez, J. L., and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1771-7.
 112. **Mathew, M. K., C. F. Hui, C. L. Smith, and C. R. Cantor.** 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 4. Influence of DNA topology. *Biochemistry* **27**:9222-6.
 113. **Mathew, M. K., C. L. Smith, and C. R. Cantor.** 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and the effect of agarose and temperature. *Biochemistry* **27**:9204-10.
 114. **Mathew, M. K., C. L. Smith, and C. R. Cantor.** 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 2. Effect of pulse time and electric field strength and implications for models of the separation process. *Biochemistry* **27**:9210-6.
 115. **Matsuoka, M., K. Endou, H. Kobayashi, M. Inoue, and Y. Nakajima.** 1998. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **167**:221-7.
 116. **Mazzei, T., E. Mini, A. Novelli, and P. Periti.** 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother* **31 Suppl C**:1-9.
 117. **McNicholas, P. M., P. A. Mann, D. J. Najarian, L. Miesel, R. S. Hare, and T. A. Black.** 2001. Effects of mutations in ribosomal protein L16 on susceptibility and accumulation of evernimicin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:79-83.
 118. **McNicholas, P. M., D. J. Najarian, P. A. Mann, D. Hesk, R. S. Hare, K. J. Shaw, and T. A. Black.** 2000. Evernimicin binds exclusively to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation in cell-free systems derived from both gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1121-6.
 119. **Michel-Briand, Y.** 1978. [Mechanism of action of antibiotics:some examples]. *C R Seances Soc Biol Fil* **172**:609-27.
 120. **Moazed, D., and H. F. Noller.** 1989. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**:585-97.
 121. **Moazed, D., J. M. Robertson, and H. F. Noller.** 1988. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**:362-4.

122. **Moellering, R. C., Jr.** 1998. Problems with antimicrobial resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* **26**:1177-8.
123. **Moore, R. A., D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman, and D. E. Woods.** 1999. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:465-70.
124. **Muller, M., and G. Blobel.** 1984. In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:7421-5.
125. **Mulligan, M. J., and C. G. Cobbs.** 1989. Bacteriostatic versus bactericidal activity. *Infect Dis Clin North Am* **3**:389-98.
126. **Murphy, E., L. Huwyler, and C. de Freire Bastos Mdo.** 1985. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *Embo J* **4**:3357-65.
127. **Murray, R. W., E. P. Melchior, J. C. Hagadorn, and K. R. Marotti.** 2001. *Staphylococcus aureus* cell extract transcription-translation assay: firefly luciferase reporter system for evaluating protein translation inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1900-4.
128. **Murray, R. W., R. D. Schaadt, G. E. Zurenko, and K. R. Marotti.** 1998. Ribosomes from an oxazolidinone-resistant mutant confer resistance to eperzolid in a *Staphylococcus aureus* cell-free transcription-translation assay. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:947-50.
129. **Nagaev, I., J. Bjorkman, D. I. Andersson, and D. Hughes.** 2001. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **40**:433-9.
130. **Nagai, K., P. C. Appelbaum, T. A. Davies, L. M. Kelly, D. B. Hoellman, A. T. Andrasevic, L. Drukalska, W. Hryniewicz, M. R. Jacobs, J. Kolman, J. Miciuleviciene, M. Pana, L. Setchanova, M. K. Thege, H. Hupkova, J. Trupl, and P. Urbaskova.** 2002. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 *Pneumococci* from 10 central and Eastern European countries. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:371-7.

-
131. **Nakagawa, A., T. Nakashima, M. Taniguchi, H. Hosaka, M. Kimura, and I. Tanaka.** 1999. The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome. *Embo J* **18**:1459-67.
 132. **Nikaido, H.** University of California, Berkeley, USA, persönliche unveröffentlichte Mitteilung.
 133. **Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, and T. A. Steitz.** 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**:920-30.
 134. **Noller, H. F.** 1991. Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem* **60**:191-227.
 135. **Noller, H. F., and C. R. Woese.** 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* **212**:403-11.
 136. **Nord, C. E., and M. Hedberg.** 1990. Resistance to beta-lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 2**:S231-4.
 137. **Normark, B. H., and S. Normark.** 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* **252**:91-106.
 138. **Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:10-3.
 139. **Ofengand, J.** 2002. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* **514**:17-25.
 140. **Ofengand, J., M. Del Campo, and Y. Kaya.** 2001. Mapping pseudouridines in RNA molecules. *Methods* **25**:365-73.
 141. **Pantucek, R., F. Gotz, J. Doskar, and S. Rosypal.** 1996. Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* **46**:216-22.
 142. **Payne, J. W., and M. W. Smith.** 1994. Peptide transport by micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **36**:1-80.
 143. **Podbielski, A., and B. A. Leonard.** 1998. The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease. *Mol Microbiol* **28**:1323-34.

144. **Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:672-93.
145. **Rapp, R. P.** 2000. Overview of resistant gram-positive pathogens in the surgical patient. *Surg Infect (Larchmt)* **1**:39-47.
146. **Rasmussen, B. A., K. Bush, and F. P. Tally.** 1997. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**:S110-20.
147. **Raychaudhuri, S., L. Niu, J. Conrad, B. G. Lane, and J. Ofengand.** 1999. Functional effect of deletion and mutation of the Escherichia coli ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *J Biol Chem* **274**:18880-6.
148. **Rebeck, G. W., and L. Samson.** 1991. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of Escherichia coli strains lacking the ogt O6-methylguanine DNA repair methyltransferase. *J Bacteriol* **173**:2068-76.
149. **Reynolds, M. G.** 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant Escherichia coli. *Genetics* **156**:1471-81.
150. **Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, C. E. Jones, A. H. Ratyal, Y. W. Miller, S. Vyakrnam, and W. J. Cunliffe.** 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1162-5.
151. **Rouch, D. A., L. J. Messerotti, L. S. Loo, C. A. Jackson, and R. A. Skurray.** 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from Staphylococcus aureus encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol* **3**:161-75.
152. **Rowland, S. J., and K. G. Dyke.** 1990. Tn552, a novel transposable element from Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **4**:961-75.
153. **Saunders, K. E., K. J. McGovern, and J. G. Fox.** 1997. Use of pulsed-field gel electrophoresis to determine genomic diversity in strains of Helicobacter hepaticus from geographically distant locations. *J Clin Microbiol* **35**:2859-63.
154. **Shain, C. S., and G. W. Amsden.** 2002. Telithromycin: the first of the ketolides. *Ann Pharmacother* **36**:452-64.
155. **Shapiro, J. A.** 1997. Genome organization, natural genetic engineering and adaptive mutation. *Trends Genet* **13**:98-104.

-
156. **Sigmund, C. D., M. Ettayebi, and E. A. Morgan.** 1984. Antibiotic resistance mutations in 16S and 23S ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **12**:4653-63.
157. **Skinner, R., E. Cundliffe, and F. J. Schmidt.** 1983. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J Biol Chem* **258**:12702-6.
158. **Skold, O.** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**:261-73.
159. **Smith, M. W., D. R. Tyreman, G. M. Payne, N. J. Marshall, and J. W. Payne.** 1999. Substrate specificity of the periplasmic dipeptide-binding protein from *Escherichia coli*: experimental basis for the design of peptide prodrugs. *Microbiology* **145 (Pt 10)**:2891-901.
160. **Sokolov, V. V., S. I. Kozhushkov, S. Nikolskaya, V. N. Belov, M. EsSayed, and A. deMeijere.** 1998. Total synthesis of TAN-1057 A/B, a new dipeptide antibiotic from *Flexibacter* sp. PK-74. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**:777-83.
161. **Sor, F., and H. Fukuhara.** 1982. Identification of two erythromycin resistance mutations in the mitochondrial gene coding for the large ribosomal RNA in yeast. *Nucleic Acids Res* **10**:6571-7.
162. **Soultanas, P., M. S. Dillingham, and D. B. Wigley.** 1998. *Escherichia coli* ribosomal protein L3 stimulates the helicase activity of the *Bacillus stearothermophilus* PcrA helicase. *Nucleic Acids Res* **26**:2374-9.
163. **Spahn, C. M., M. A. Schafer, A. A. Krayevsky, and K. H. Nierhaus.** 1996. Conserved nucleotides of 23 S rRNA located at the ribosomal peptidyltransferase center. *J Biol Chem* **271**:32857-62.
164. **Sprinzi, M., S. Brock, Y. Huang, P. Milovnik, M. Nanninga, M. Nesper-Brock, H. Rutthard, and K. Szkaradkiewicz.** 2000. Regulation of GTPases in the bacterial translation machinery. *Biol Chem* **381**:367-75.
165. **Suller, M. T., and D. Lloyd.** 2002. The antibacterial activity of vancomycin towards *Staphylococcus aureus* under aerobic and anaerobic conditions. *J Appl Microbiol* **92**:866-72.

166. **Tait-Kamradt, A., T. Davies, P. C. Appelbaum, F. Depardieu, P. Courvalin, J. Petitpas, L. Wondrack, A. Walker, M. R. Jacobs, and J. Sutcliffe.** 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3395-401.
167. **Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, and J. Sutcliffe.** 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2118-25.
168. **Then, R. L.** 1982. Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Infect Dis* **4**:261-9.
169. **Therrien, C., and R. C. Levesque.** 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol Rev* **24**:251-62.
170. **Uhlein, M., W. Weglohner, H. Urlaub, and B. Wittmann-Liebold.** 1998. Functional implications of ribosomal protein L2 in protein biosynthesis as shown by in vivo replacement studies. *Biochem J* **331 (Pt 2)**:423-30.
171. **Urbonavicius, J., Q. Qian, J. M. Durand, T. G. Hagervall, and G. R. Bjork.** 2001. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *Embo J* **20**:4863-73.
172. **Vester, B., and S. Douthwaite.** 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1-12.
173. **Vester, B., and R. A. Garrett.** 1987. A plasmid-coded and site-directed mutation in *Escherichia coli* 23S RNA that confers resistance to erythromycin: implications for the mechanism of action of erythromycin. *Biochimie* **69**:891-900.
174. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1515-21.
175. **Ward, J. B.** 1974. The synthesis of peptidoglycan in an autolysin-deficient mutant of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C. 6346 and the effect of beta-lactam antibiotics, bacitracin and vancomycin. *Biochem J* **141**:227-41.

-
176. **Wichelhaus, T. A., B. Boddington, S. Besier, V. Schafer, V. Brade, and A. Ludwig.** 2002. Biological cost of rifampin resistance from the perspective of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3381-5.
 177. **Widdowson, C. A., and K. P. Klugman.** 1999. Molecular mechanisms of resistance to commonly used non-beta-lactam drugs in *Streptococcus pneumoniae*. *Semin Respir Infect* **14**:255-68.
 178. **Widdowson, C. A., and K. P. Klugman.** 1998. The molecular mechanisms of tetracycline resistance in the pneumococcus. *Microb Drug Resist* **4**:79-84.
 179. **Williams, R. M., C. Yuan, V. J. Lee, and S. Chamberland.** 1998. Synthesis and antimicrobial evaluation of TAN-1057A/B analogs. *J Antibiot (Tokyo)* **51**:189-201.
 180. **Willumeit, R., S. Forthmann, J. Beckmann, G. Diedrich, R. Ratering, H. B. Stuhmann, and K. H. Nierhaus.** 2001. Localization of the protein L2 in the 50 S subunit and the 70 S *E. coli* ribosome. *J Mol Biol* **305**:167-77.
 181. **Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan.** 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**:327-39.
 182. **Wittmann-Liebold, B., M. Uhlein, H. Urlaub, E. C. Muller, A. Otto, and O. Bischof.** 1995. Structural and functional implications in the eubacterial ribosome as revealed by protein-rRNA and antibiotic contact sites. *Biochem Cell Biol* **73**:1187-97.
 183. **Wood, M. J., and R. C. Moellering, Jr.** 2003. Microbial resistance: bacteria and more. *Clin Infect Dis* **36**:S2-3.
 184. **Wower, I. K., J. Wower, and R. A. Zimmermann.** 1998. Ribosomal protein L27 participates in both 50 S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *J Biol Chem* **273**:19847-52.
 185. **Wower, J., S. V. Kirillov, I. K. Wower, S. Guven, S. S. Hixson, and R. A. Zimmermann.** 2000. Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome. Cross-linking of the 3' end of tRNA to specific nucleotides of the 23 S ribosomal RNA at the A, P, and E sites. *J Biol Chem* **275**:37887-94.
 186. **Wower, J., I. K. Wower, S. V. Kirillov, K. V. Rosen, S. S. Hixson, and R. A. Zimmermann.** 1995. Peptidyl transferase and beyond. *Biochem Cell Biol* **73**:1041-7.

187. **Wu, S. W., H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 1999. The *Staphylococcus aureus* transposon Tn551: complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the expression of the erythromycin resistance gene. *Microb Drug Resist* **5**:1-7.
188. **Wu, X. Q., P. Iyengar, and U. L. RajBhandary.** 1996. Ribosome-initiator tRNA complex as an intermediate in translation initiation in *Escherichia coli* revealed by use of mutant initiator tRNAs and specialized ribosomes. *Embo J* **15**:4734-9.
189. **Xiong, L., P. Kloss, S. Douthwaite, N. M. Andersen, S. Swaney, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin.** 2000. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J Bacteriol* **182**:5325-31.
190. **Yuan, C. G., and R. M. Williams.** 1997. Total synthesis of the anti methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptideantibiotics TAN-1057A-D. *J. Am. Chem. Soc.* **119**:11777-84.
191. **Zabel, L. T., W. Lenz, and E. Schwab.** 2000. [Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Studies at a traumatic surgery clinic, 1994-1997]. *Unfallchirurg* **103**:557-63.

8 Abkürzungsverzeichnis

Größeneinheiten

p	pico-
n	nano-
μ	mikro-
m	milli-
K	Kilo-
M	Mega-

Mengeneinheiten

Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
M	Mol
U	Unit
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
vol	Volumen

Elektrische Einheiten

A	Ampere
O	Ohm
V	Volt
W	Watt

Zeiteinheiten

s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde

Abkürzungen

70S	bakterielle Ribosomen
30S	kleine ribosomale Untereinheit
50S	große ribosomale Untereinheit
°C	Grad Celsius
A [x nm]	Lichtabsorption bei x Nanometern
AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxysulfat
ATP	Desoxyadenosintriphosphat
BP	Basenpaare
BHI	Brain Heart Medium
ca.	circa
CAM	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CCPM	corrected counts per minute
CTP	Desoxycytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxyd
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERY	Erythromycin
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GTP	Desoxyguanosintriphosphat
HN818TA	Resistenzentwicklung von <i>E. coli</i> HN818 gegen TAN1057, Reihe A
LMP-Agarose	Low melting Point Agarose
LB-Medium	Luria Bertani Medium
MH-Medium	Müller-Hinton Medium

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MP-Agarose	Multi Purpose Agarose
mp-H ₂ O	Millipore-Wasser (18.2 MOhm)
MW	Mittelwert
mRNA	messenger RNA
OAc	Acetat
OD ₅₇₈	Optische Dichte einer Lösung bei 578 nm
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
rRNA	ribosomale RNA
S30	postribosomaler Überstand nach Zentrifugation bei 30000 g
S150	postribosomaler Überstand nach Zentrifugation bei 100000 g
SA133TA	Resistenzentwicklung von <i>S. aureus</i> 133 gegen TAN1057, Reihe A
SA133TA0-6	An Tag 0 bis 6 der Resistenzentwicklung SA133TA isolierte und Bakterienstämme.
SA133TA6a	Nach sechstägigem Ausplattieren des TAN1057-resistenten <i>S. aureus</i> Stammes SA133TA6 auf FKS-Agarplatten ohne TAN1057 isolierter Bakterienstamm.
SA133TB-F	Resistenzentwicklungen von <i>S. aureus</i> 133 gegen TAN1057, unabhängige Resistenzreihen B - F
SA4220TA-C	Resistenzentwicklungen von <i>S. aureus</i> RN4220 gegen TAN1057, unabhängige Resistenzreihen A - C
SA4220CA	Resistenzentwicklung von <i>S. aureus</i> RN4220 gegen Chloramphenicol, Reihe A

SA4220EA	Resistenzentwicklung von <i>S. aureus</i> RN4220 gegen Erythromycin, Reihe A
SA4220	Nach sechstägiger, serieller Inkubation von <i>S. aureus</i> RN4220 in reinem FKS-Medium isolierter Bakterienstamm.
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
T/T	Transkription/Translation
Tab.	Tabelle
TAN1057	diastereomeres Gemisch aus TAN1057A und TAN1057B
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxy)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TTP	Desoxythymidintriphosphat
üN	über Nacht
Ψ	Pseudoutidin
UV	ultraviolett
UTP	Desoxyuraciltriphosphat
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Wirkorte der wichtigsten Antibiotika-Gruppen an und in der bakteriellen Zelle. Quelle: modifiziert nach [69].....	2
Abbildung 2 :	Aufbau und Struktur der bakteriellen Zellwand. Links: gram-positiv, rechts: gram-negativ. Quelle: modifiziert nach [69]	4
Abbildung 3:	Die Bestandteile der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit. Quelle: modifiziert nach [9, 62, 181].....	6
Abbildung 4:	Konservierte Basensequenzen der 5`Hälfte der 23S-rRNA. Quelle: [42].....	7
Abbildung 5:	Konservierte Basensequenzen der 3`Hälfte der 23S-rRNA. Quelle: [43].....	8
Abbildung 6:	Position der 23S-rRNA-Pseudouridine in <i>E. coli</i> . Quelle: [38]	10
Abbildung 7:	Position der tRNA-Pseudouridine in <i>E. coli</i> . Quelle: [38].....	11
Abbildung 8:	Substanzstruktur TAN1057A.....	21
Abbildung 9:	Substanzstruktur TAN1057B.....	21
Abbildung 10:	Substanzstruktur TAN1057C.....	21
Abbildung 11:	Substanzstruktur TAN1057D.....	22
Abbildung 12:	Minimale Hemmkonzentration der TAN1057-resistenten <i>S. aureus</i> Stämme.....	61
Abbildung 13:	Wachstumsgeschwindigkeit <i>S. aureus</i> Isolate aus der TAN1057-Resistenzentwicklung SA133TA0 bis SA133TA6a.....	65
Abbildung 14:	Restriktionsmuster <i>Sma</i> I geschnittener genomischer <i>S. aureus</i> DNA	69
Abbildung 15:	IC ₅₀ -Bestimmung von Erythromycin auf S30-Extrakt aus SA133TA0	72
Abbildung 16:	IC ₅₀ -Bestimmung von TAN1057 auf S30-Extrakt aus SA133TA0 ...	73
Abbildung 17:	Hemmung der Proteinsynthese von TAN1057 in S30-Extrakten aus <i>S. aureus</i> SA133TA0 bis SA133TA6a.....	77
Abbildung 18:	Hemmung der Proteinsynthese von Erythromycin in S30-Extrakten aus <i>S. aureus</i> SA133TA0 bis SA133TA6a.....	78
Abbildung 19:	In vitro Transkription/Translation mit 70S- und S150-Fractionen aus SA133TA0 (MHK TAN1057=0,125 µg/ml) und SA133TA6a (MHK TAN1057= >64 µg/ml).....	79

Abbildung 20:	Schwache Basenpaarung C-A in Helix 18 / Domäne I der 23S-rRNA durch die Mutation U392C (A) und schwache Basenpaarung U-G in Helix 83 / Domäne V der 23S-rRNA durch die Mutation C2321U (B). Abbildungen modifiziert nach: [99]	84
Abbildung 21:	Sekundärstruktur der 5' Hälfte der großen ribosomalen Untereinheit mit markierter Position 392 (U->C). Quelle: modifiziert nach [24]....	85
Abbildung 22:	Sekundärstruktur der 3' Hälfte der großen ribosomalen Untereinheit mit markierter Position 2321 (C->U). Quelle: modifiziert nach [24]..	86
Abbildung 23:	Phylogenetischer Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Pseudouridinsynthase TruA. Nomenklatur der verwendeten Organismen siehe Kapitel 3.5	93
Abbildung 24:	Phylogenetischer Vergleich der L3-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei <i>S. aureus</i> SA133TA6a gefundenen Mutationen. Verwendete Organismen: siehe Kapitel 3.5	102
Abbildung 25:	Phylogenetischer Vergleich der L2-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> gefundenen Deletionsmutation. Verwendete Organismen: siehe Kapitel 3.5	111
Abbildung 26:	Vergleich IC_{50} und MHK von TAN1057 auf <i>S. aureus</i> SA133TA0 bis SA133TA6a.....	120
Abbildung 27:	Schematische Darstellung der 23S-rRNA Sekundärstruktur im Bereich der Domäne V. Quelle: [34].....	124
Abbildung 28:	Übersicht über die RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L2 aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> . Quelle: [131]	132
Abbildung 29:	Sequenzvergleich der ribosomalen Bindedomäne von L2 mit korrelierender Domänenstruktur. Mutationen, welche die Bindung der ribosomalen RNA beeinträchtigen sind markiert (*). Quelle:[131].	133
Abbildung 30:	Bindungsstelle des Proteins L2 an der ribosomalen 23S-rRNA. Quelle: [61].....	134
Abbildung 31:	Lage der L- Proteine, die mit dem Peptidyltransferasezentrum (PT) der Domäne V der 23S-rRNA interagieren (Abb. A) und die vier ribosomalen Proteine mit der größten räumlichen Nähe zum Peptidyltransferasezentrum (Abb. B). Quelle [133]	135

Abbildung 32: Phylogenetischer Vergleich der L2-Aminosäuresequenzen im Bereich der bei S. aureus und E. coli gefundenen Deletionsmutation. Verwendete Organismen: siehe Tabelle 16a / 16b 137

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>Auflistung der wichtigsten Antibiotika-Klassen und ihrer Wirkorte</i>	3
Tabelle 2:	<i>Die Pseudouridinsynthasen in E. coli</i>	11
Tabelle 3:	<i>Efflux-Pumpen in Staphylococcus, Gen-Lokation und Substrat. Quelle: [90, 102, 108]</i>	19
Tabelle 4:	<i>Konzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Antibiotika (Stocklösungen)</i>	36
Tabelle 5:	<i>Primer-Sequenzen zur Amplifikation der 5 23S-rRNA Operons aus S. aureus</i>	45
Tabelle 6:	<i>PCR-Parameter zur Amplifikation der rRNA-Operons aus S. aureus.</i>	46
Tabelle 7:	<i>Primer zur Sequenzierung der 23S-rRNA im Bereich der in S. aureus SA133TA6a gefundenen Punktmutationen U392C und C2321U.</i>	46
Tabelle 8:	<i>Primer-Sequenzen zur Amplifikation der 7 Pseudouridinsynthasen (Ψ) aus S. aureus</i>	47
Tabelle 9:	<i>PCR-Parameter zur Amplifikation der 7 Pseudouridin- Synthasen von S. aureus.</i>	47
Tabelle 10:	<i>Zusätzliche Primer zur Sequenzierung des Pseudouridinsynthase- Operons TruB in S. aureus</i>	48
Tabelle 11:	<i>PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation sämtlicher L-Proteine aus S. aureus.</i>	48
Tabelle 12:	<i>PCR-Parameter zur Amplifikation aller ribosomalen L-Proteine aus S. aureus.</i>	49
Tabelle 13:	<i>Zusätzliche Primer zur Sequenzierung der L-Protein Operons rplR-F, rplE-X-N und rplB-W-D-C in S. aureus</i>	50
Tabelle 14:	<i>PCR-Primer zur spezifischen Amplifikation von rplB aus E. coli</i>	50
Tabelle 15:	<i>PCR-Parameter zur Amplifikation aller ribosomalen L-Proteine aus S. aureus</i>	50
Tabelle 16a:	<i>Abkürzungen der für die phylogenetischen Untersuchungen verwendeten Organismen</i>	52
Tabelle 16b:	<i>Abkürzungen der für die phylogenetischen Untersuchungen verwendeten Organismen (Fortsetzung)</i>	53
Tabelle 17:	<i>T/T-Reaktion: Komponenten & Volumina</i>	56
Tabelle 18:	<i>Aufbereiten von ³⁵S-Methionin-haltigen Proteinen zur Quantifizierung per Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter</i>	58

<i>Tabelle 19: Sechstägige Resistenzentwicklung von S. aureus 133 gegen TAN1057</i>	60
<i>Tabelle 20: Übersicht der durchgeführten Resistenzentwicklungen. (Nomenklatur der Resistenzreihe, Ausgangsstamm und Substanz)</i>	62
<i>Tabelle 21: MHKs der durchgeführten Resistenzentwicklungen pro Tag</i>	63
<i>Tabelle 22: Minimale Hemmkonzentration von 19 Kontrollsubstanzen gegen S. aureus SA133TA0 und SA133TA6a</i>	68
<i>Tabelle 23: Vergleich der IC₅₀-Bestimmung mittels Autoradiographie und Scintillationszähler</i>	74
<i>Tabelle 24: Zusammenfassung der IC₅₀-Werte von Erythromycin und TAN1057 auf S30-Extrakte aus SA133TA0-SA133TA6a</i>	75
<i>Tabelle 25: Statistische Analyse der IC₅₀-Werte von TAN1057 auf S30-Extrakte aus S. aureus SA133TA0 bis SA133TA6a</i>	75
<i>Tabelle 26: Statistische Analyse der IC₅₀-Werte von Erythromycin auf S30-Extrakte aus S. aureus SA133TA0 bis SA133TA6a</i>	77
<i>Tabelle 27: Differenzen in der Aminosäuresequenz aller 7 Pseudouridinsynthesen aus S. aureus SA133TA6a, Mu50, N315 und MW2 im Vergleich zum TAN1057-sensitiven S. aureus Stamm SA133TA0</i>	90
<i>Tabelle 28: Differenzen in der Aminosäuresequenz aller ribosomalen L-Proteine des TAN1057-resistenten S. aureus Stamms SA133TA6a zu den Stämmen Mu50, N315, MW2 und SA133TA0</i>	96
<i>Tabelle 29: Das Auftreten der L2-Deletionsmutation im Vergleich zur Entwicklung der TAN1057-Resistenz</i>	107
<i>Tabelle 30: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der S. aureus Stämme SA133TA0-SA133TA6a</i>	121
<i>Tabelle 31: Das Auftreten der L2-Deletionsmutation im Vergleich zur Entwicklung der TAN1057-Resistenz und dem IC₅₀-Wert der gekoppelten Transkription/Translation</i>	131

11 Kurzzusammenfassung

Die intensive Nutzung von Antibiotika hat zur raschen Verbreitung von antibiotikaresistenten Pathogenen geführt [104, 106, 107, 122, 145, 183]. Es besteht deshalb der dringende Bedarf an neuen Antibiotika, die keine Kreuzresistenz mit anderen Substanzklassen zeigen [14, 183]. Das Dipeptid-Antibiotikum TAN1057 [67] zeigt in Tiermodellen sowie unter geeigneten Testbedingungen *in vitro* exzellente antibakterielle Wirkung gegen Staphylokokken einschließlich *S. epidermidis* und Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen (MRSA) [20].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Wirkmechanismus von TAN1057 und die molekularen Ursachen der Resistenzentwicklung in *S. aureus* untersucht. In mehreren unabhängigen Experimenten stieg unter Selektionsdruck über 6 Tage die Resistenz der Bakterien täglich um den Faktor 2 bis 4 an. Nach sechstägiger Selektion lagen hochresistente *S. aureus* Stämme mit stabiler Resistenz (MHK: >64 µg/ml) vor. Die TAN1057-resistenten *S. aureus* Stämme wiesen keine Kreuzresistenz gegenüber anderen antibakteriellen Substanzen auf. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass TAN1057 die bakterielle Translation mittels eines neuen Wirkmechanismus inhibiert.

Mittels eines *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems wurde gezeigt, dass sich die TAN1057-Resistenz auf ribosomaler Ebene in einem einzelnen Sprung während der sechstägigen Resistenzselektion manifestierte. Neben der resistenzvermittelnden Modifikation des Wirkortes von TAN1057 tragen demnach auch andere Ursachen, wie z. B. eine verringerte Substanzaufnahme oder ein Efflux-Mechanismus zur Gesamtresistenz bei.

Zur Analyse der ribosomalen Resistenz wurden PCR-Primer entwickelt, die erstmalig die selektive Amplifikation und Sequenzierung aller 23S-rRNA Operons, der Pseudouridinsynthasen sowie sämtlicher L-Proteine in *S. aureus* ermöglichten.

Die Selektion TAN1057-resistenter *S. aureus* Stämme führte reproduzierbar zu Bakterienstämmen einer spezifischen Glycindeletion innerhalb des ribosomalen L2-Proteins. Diese Mutation wurde vor dem Anstieg der ribosomalen Resistenz nachgewiesen und konnte demnach nicht der Auslöser der ribosomalen Resistenz sein. Aufgrund des reproduzierbaren, TAN1057-spezifischen Auftretens während der Resistenzselektion sowohl in *S. aureus* als auch in *E. coli* besteht zwischen der Glycindeletion im ribosomalen Protein L2 und dem Wirk- bzw. Resistenzmechanismus von TAN1057 jedoch ein ursächlicher Zusammenhang.

12 Abstract

The extensive use of antibiotics has led to the rapid spread of drug resistant pathogens [104, 106, 107, 122, 145, 183]. There is a critical need for new antimicrobial compounds lacking cross resistance to other substance classes [14, 183]. The dipeptide antibiotic TAN1057 [67] displays excellent antibiotic activity *in vivo* and *in vitro* under suited test conditions against staphylococci, including *S. epidermidis* and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains [20].

In this work, we investigated the mode of action of TAN1057 and the molecular basis of resistance development in *S. aureus* against this compound. Independent resistance selection experiments over a period of six days revealed a daily increase of bacterial resistance by a factor of 2 to 4. After six days, highly resistant *S. aureus* strains with stable MICs against TAN1057 (>64 µg/ml) were observed. The selected TAN1057 resistant *S. aureus* strains displayed no cross-resistance against other antimicrobial compounds. This result supports the hypothesis that TAN1057 inhibits bacterial translation by a new mode of action.

Coupled *in vitro* transcription/translation experiments revealed that the TAN1057 resistance emerged on a ribosomal basis as a single step during the six day resistance selection. A target modification that leads to an increase in TAN1057 resistance is therefore accompanied by other causes of bacterial resistance, like lower uptake of the compound or increased cellular efflux.

To analyse the ribosomal resistance mechanism in detail, PCR-primers were designed for specific amplification and sequencing of the chromosomal operons for 23S-rRNA, pseudouridine-synthases and all ribosomal L-proteins in *S. aureus*.

The selection of TAN1057 resistant *S. aureus* strains reproducibly yielded bacteria encoding a mutant ribosomal protein L2 with one specific glycine deletion. The TAN1057 specific mutation was observed before the increase of ribosomal resistance, indicating that this mutation is not the direct elicitor for the increase in ribosomal resistance. The reproducible, TAN1057 specific appearance of this mutation during the resistance selection in *S. aureus* and *E. coli* indicates nonetheless a causal connection of the observed glycine deletion in protein L2 during the TAN1057 resistance selection and the mode of action of TAN1057.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Privatdozent Dr. Reinhold Gahlmann betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgenden Titeln publiziert:

- **E. Limburg, D. Beyer and R. Gahlmann.** 2002. *S. aureus* resistance to TAN1057 is mediated by modification of the bacterial ribosome. 42nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., 27. – 30. September, San Diego, CA, USA, Abstract F-2032

- **E. Limburg, R. Gahlmann, H-P. Kroll and D. Beyer.** 2004. Ribosomal alterations contribute to bacterial resistance against the dipeptide antibiotic TAN1057. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:619-22.

Köln, den

.....
Endrik Limburg

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name, Vorname	Limburg, Endrik
Anschrift	Hufelandstr. 135 51061 Köln
Geburtsdatum	7. November 1969
Geburtsort	Köln
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1975 - 1989	Grundschule und Gymnasium in Köln
1989	Abitur

Wehrdienst

1989-1990	Materialamt der Luftwaffe
-----------	---------------------------

Studium

Oktober 1991 - September 1992	Studium an der University of Essex, Colchester (UK) im Fach Biologie
Oktober 1992 - Oktober 1998	Studium an der Universität zu Köln im Fach Biologie
Oktober 1998 - Dezember 1999	Diplomarbeit an der Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln, durchgeführt im Pharmaforschungszentrum der Bayer AG, Wuppertal zum Thema „Klonierung, Überexpression, Aufreinigung und funktionelle Testung der Primase von <i>Bacillus subtilis</i> “.
Abschluss	Diplombiologe

Februar 2000 - 2004

Promotionsarbeit an der Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln, durchgeführt im Pharmaforschungszentrum der Bayer AG, Wuppertal zum Thema „Molekulare und biochemische Charakterisierung des Wirk- und Resistenzmechanismus von TAN1057 in *Staphylococcus aureus*“.

Disputation

04. Februar 2004

Fort- und Weiterbildung

2001

Erfolgreiche Teilnahme an der Bayer International Management Simulation (B.I.M.S.)