Universität Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. S. Stenger

Einfluss von Cytarabin auf die Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus mitis*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Martina Furitsch

geboren in Tettnang

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Spellerberg

2. Berichterstatter: PD Dr. Ansgar Schulz

Tag der Promotion: 17.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **I**

1 Einleitung **2**

1.1 *Streptococcus mitis* 2

1.2 Leukämie 3

1.3 Cytarabin 5

1.4 Infektionen bei akuten Leukämien 7

1.5 Zielsetzung 9

2 Material und Methoden **10**

2.1 Geräte 10

2.2 Verbrauchsmaterialien 12

2.3 Substanzen 14

2.4 Bakterienstämme 16

2.5 Lösungen 20

2.6 Reihenverdünnungstest 30

2.7 Nachweis des Autolyse Gens *lytA* 32

2.8 Pulsfeldgelelektrophorese 35

2.9 Proteom 38

2.10 Wasserstoffperoxid Messung 46

3 Ergebnisse **52**

3.1 Reihenverdünnungstest 52
3.2 Nachweis des Autolyse Gens *lytA* 53
3.3 Pulsfeldgelelektrophorese 54
3.4 Proteom 55
3.5 Wasserstoffperoxid Messung 60

4 Diskussion **64**
4.1 Reihenverdünnungstest 64
4.2 Nachweis des Autolyse Gens *LytA* 65
4.3 Pulsfeldgelelektrophorese 66
4.4 Proteom 70
4.5 Wasserstoffperoxid Nachweis 75

5 Zusammenfassung **79**

6 Literaturverzeichnis **80**

Abbildungsverzeichnis **90**

Tabellenverzeichnis **92**

Danksagung **93**

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zwei-Dimensional
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CSB	Cell Suspensions Buffer
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
evtl.	eventuell

FAB	French-American-British
g	Gramm
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks Balanced Saline Solution
HCl	Chlorwasserstoff
H_2O	Wasser
H_3PO_4	Ortho-Phosphorsäure
IPG	Immobilisierter pH Gradient
KCl	Kaliumchlorid
K_2HPO_4	Kaliumhydrogendiphosphat
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Molar
Min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddisumutase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD_{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate buffered saline

PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	Potentia hydrogenii: Maßzahl für saure / alkalische Substanzen
pmol	Pikomol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
s.o.	siehe oben
spp.	species
spxB	Streptococcus pyruvate oxidase
STT	Streptococcus mitis
STO	Streptococcus oralis
s.u.	siehe unten
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Natriumsalz
THY	Todd Hewitt Yeast Broth
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/Min	Umdrehungen/Minute
ZNS	Zentralnervensystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
WHO	World Health Organisation

Kapitel 1

Einleitung

1.1 *Streptococcus mitis*

Streptococcus mitis gehört zur Gruppe der Viridans-Streptokokken, welche als Katalase-negative, grampositive Kettenkokken beschrieben werden [14].

1.1.1 Einteilung und Taxonomie

Die Taxonomie der Streptokokken ist derzeit im Wandel, da neue Bakterienstämme identifiziert und eingeordnet werden müssen [23] und die molekulare Analyse der Taxonomie ältere taxonomische Einteilungen nicht in allen Aspekten bestätigen konnte. *Streptococcus mitis* gehört zu den nicht-betahämolysierenden Streptokokken der Viridansgruppe. Viridans-Streptokokken werden auch als vergrünende bzw. alphahämolysierende Streptokokken bezeichnet. Sie werden aufgrund der 16S-rDNA-Sequenz in fünf weitere Untergruppen unterteilt. Dies sind die Mutans-Gruppe, die Salivarius-Gruppe, die Anginosus-Gruppe, die Sanguinis-Gruppe und die Mitis-Gruppe zu welcher die in dieser Arbeit untersuchten *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* zählen [6, 14].

1.1.2 Klinische Relevanz

Viridans-Streptokokken sind Teil der Normalflora des Respirations-, Genital-, und Gastrointestinaltrakts [6, 24]. *Streptococcus mitis* ist ein typischer Vertreter der Normalflora des oberen Respirationstrakts des Menschen [22, 23, 39]. Viridans-Streptokokken weisen in immunkompetenten Personen eine niedrige Pathogenität auf und führen gelegentlich zu subakuter bakterieller Endokarditis oder eitrigen Abszessen [23, 25, 39]. Bei immungeschwächten Personen manifestieren sich Infektionen als isolierte Bakteriämie, Fieber, Hypotension, Schock, Pneumonie, ARDS, Meningitis oder Sepsis [23, 24, 25, 34, 39, 66].

1.2 Leukämie

Der Begriff Leukämie steht für „weißes Blut“und wurde von Rudolf Virchow geprägt, der damit die vermehrte Leukozytenzahl der chronisch myeloischen Leukämie beschrieb. Die Leukämie umfasst drei Krankheitsbilder hämatologischer Tumorerkrankungen, wobei die akuten Leukämien in akute lymphatische Leukämie und akute myeloische Leukämie unterteilt werden. Bei der ALL handelt es sich um die maligne Entartung von Lymphozyten-Vorläuferzellen. Die AML ist eine genetisch heterogene, erworbene Veränderung in hämatopoetischen Vorläufer-Zellen [10, 42]. Hierzu zählen Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten. Desweiteren zählen die chronisch myeloische Leukämie (ein myeloproliferatives Syndrom) und die chronisch lymphatische Leukämie (ein Non-Hodgkin-Lymphom) zu den Krankheitsbildern der Leukämie. In dieser Arbeit ist das Augenmerk auf die akuten Leukämien gerichtet.

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der AML liegt bei 3,6/100.000/Jahr mit einem mittleren Erkrankungsalter von 67 Jahren (nach SEER Cancer Statistics Review 1975–2005; Surveillance, Epidemiologic and End Results 2007). Sie macht ca. 20 % der akuten Leukämien im

Kindesalter [37] und 80 % der akuten Leukämien bei Erwachsenen aus.

Bei der ALL liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 13 Jahren, die Inzidenz beträgt 1,6/100.000/Jahr. Damit ist die ALL die häufigste Tumorerkrankung im Kindesalter (nach SEER Cancer Statistics Review 1975–2005; Surveillance, Epidemiologic and End Results 2007) [53]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei ALL beträgt 64 %, es sterben ca. 0,5/100.000/Jahr. Die Prognose ist relativ günstig. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der AML beträgt im Gegensatz dazu 21,2 % und es sterben ca. 2,7/100.000/Jahr (nach SEER Cancer Statistics Review 1975–2005; Surveillance, Epidemiologic and End Results 2007). Infektionen sind heute der Hauptfaktor für die hohe Morbidität und Mortalität bei Leukämie-Patienten [34, 37, 42, 57]

1.2.2 Klinik

Die Klinik der akuten Leukämien ist gekennzeichnet durch Allgemeinsymptome mit kurzer Anamnese wie Abgeschlagenheit, Fieber und Nachtschweiss. Aufgrund der Verdrängung der Hämatopoese zeigen die Patienten eine hohe Anfälligkeit für bakterielle Infekte [57]. Beschwerden als Folge einer Anämie wie Blässe, Dyspnoe und Müdigkeit sowie Blutungen infolge Thrombozytopenie sind weitere Symptome. Desweiteren können Lymphknoten-Schwellung, Splenomegalie, Meningitis leucaemica im Rahmen einer akuten Leukämie auftreten.

1.2.3 Diagnostik

Die Diagnose der akute Leukämie wird aufgrund der Klinik, des Blutbildes und des Knochenmark-Befundes, welcher die Zytologie, Zytochemie, Zytogenetik, Immunphänotypisierung und Molekulargenetik umfasst, gestellt.

Die AML wird nach morphologischen und zytochemischen Merkmalen der Blasten in Knochenmark und Blut klassifiziert. Dies erfolgt nach den Kriterien der FAB (French-American-British) und wurde von der WHO um die Immunphänotypisierung und genetische Besonderheiten erweitert. [20, 35].

Die Einteilung der ALL erfolgt nach den Kriterien der WHO, welche die Immunphänotypisierung, Zyto- und Molekulargenetik berücksichtigt. Auch die ALL kann nach morphologischen Kriterien der FAB klassifiziert werden. Diese sind für die Klinik nicht von Bedeutung und wurden von der WHO-Klassifikation abgelöst [20].

1.2.4 Therapieprinzipien

Zu jeder Leukämie-Therapie gehört die Behandlung der Symptome der Grunderkrankung und der Nebenwirkungen durch die Therapie.

Ziel der Chemotherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission, was eine Normalisierung von Blutbild, Knochenmark und das Verschwinden extramedullärer Manifestationen beinhaltet. Für die akuten Leukämien existieren sowohl für Kinder als auch für Erwachsene verschiedene Therapie-Schemata, die je nach Subtyp der Leukämie und Risikoprofil des Patienten angewendet und in Studien untersucht werden. Im folgenden soll ein Überblick über die verwendeten Chemotherapeutika bei ALL und AML gegeben werden.

Bei der ALL werden Kombinationen verschiedener Zytostatika wie z.B. Vincristin, Daunorubicin, Doxorubicin, L-Asparaginase, Cyclophosphamid sowie hochdosiertes Methotrexat, Cytarabin, Daunorubicin und Kortikosteroide eingesetzt [9, 17, 33, 42].

Bei der AML kommen in Standarddosierung die Zytostatika Cytarabin, Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposid, 6-Thioguanin, Methotrexat oder Hydrocortison zum Einsatz. Für die Hochdosistherapie stehen Cytarabin, 6-Thioguanin, Prednisolon, Vincristin oder Cyclophosphamid zur Verfügung [13, 37, 57].

1.3 Cytarabin

Cytosinarabinosid, oder kurz Cytarabin, (siehe Abbildung 1.1) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite und ähnelt in seiner Struktur dem Cytidin. Es

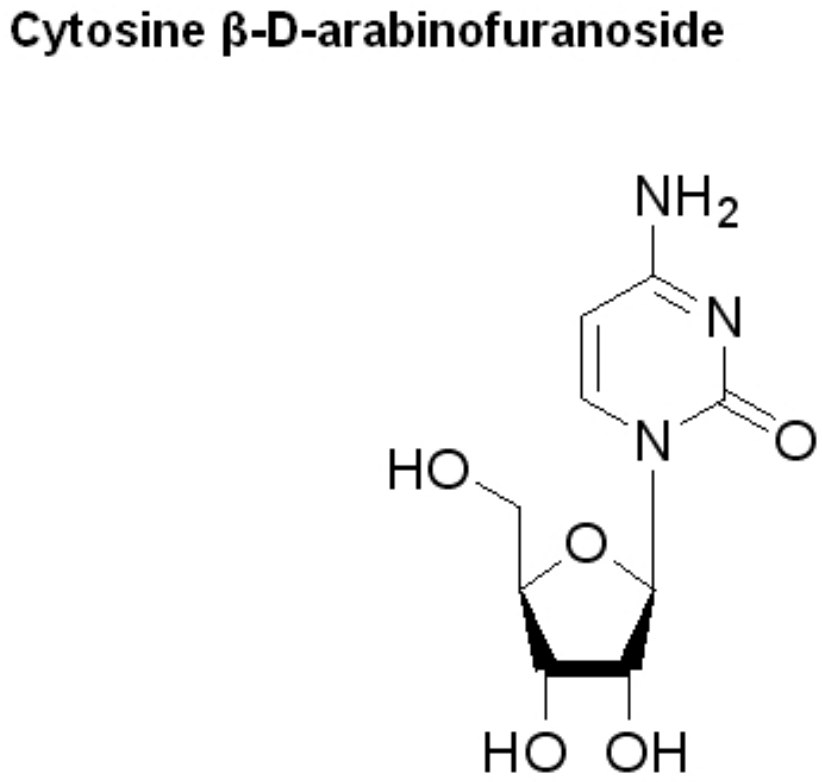

Abbildung 1.1: Strukturformel Cytarabin

hemmt die DNA-Polymerase und ist vorwiegend in der S-Phase (DNA-Synthesephase) des Zellzyklus wirksam. Es ist einer der wichtigsten Antimetabolite zur Induktion der Remission bei akuten Leukämien [18, 27]. Indikation für eine Infusionstherapie mit Cytarabin sind therapieresistente Non-Hodgkin-Lymphome, ALL, AML und rezidive akuter Leukämien [33, 42]. Eine Nebenwirkung ist die Myelosuppression, wobei die Granulozytopoese am empfindlichsten, circa 1-2 Wo nach Zytostatikagabe, reagiert. Dies führt zu erhöhter Infektanfälligkeit und septischen Komplikationen. Bei Applikation von hochdosiertem Cytarabin besteht die Gefahr der Neurotoxizität, welche sich in zentralnervösen Störungen zeigt.

1.4 Infektionen bei akuten Leukämien

Hauptgrund der hohen Morbidität und Mortalität bei akuten Leukämien sind Infektionen. Das Keimspektrum hat sich in den letzten Jahrzehnten gewandelt. In früheren Jahren wurden hauptsächlich gramnegative Keime wie *Escherichia coli*, Klebsiella spp. und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen [4]. Diese gingen in den letzten Jahrzehnten zurück, wohingegen die Isolate grampositiver Keime wie *Staphylococcus aureus*, Koagulase-negative Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken zunahmen [26]. Ein hoher Anteil der grampositiven Keime fällt auf die Viridans-Streptokokken [64]. Bei Differenzierung der Viridans-Streptokokken werden am häufigsten *Streptococcus mitis*, gefolgt von *Streptococcus oralis* nachgewiesen [6, 22, 66].

In verschiedenen Studien wurden Risikofaktoren für eine Infektion mit *Streptococcus mitis* bei Leukämie-Patienten gesucht. Die ulzerative Mukositis, welche als Komplikation während der Durchführung einer Chemotherapie häufig auftritt, wird als Eintrittspforte für die Keime vermutet [28, 58]. Die Antibiotika-Prophylaxe mit Chinolonen oder Cotrimoxazol wird ebenfalls als Risikofaktor diskutiert [24, 29]. Ein Hauptrisikofaktor stellt die Neutropenie dar [28, 40]. Unter Neutropenie versteht man die Verminderung der neutrophilen Granulozyten unter 1.500 Zellen pro μl Blut. Sie besteht bei Leukämie-Patienten zum einen aufgrund der Verdrängung der Hämatopoese durch die

Erkrankung selbst, zum anderen als Nebenwirkung der Chemotherapie [57], sowie bei Durchführung einer Knochenmarktransplantation.

Bereits 1990 beschrieben Guiot et *al.* den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Hochdosistherapie mit Cytarabin und dem Auftreten von Septikämien, ausgelöst durch Viridans-Streptokokken [19]. Ebenfalls 1990 verglichen Kern et *al.* erwachsene Leukämiepatienten, die an einer Streptokokken Bakteriämie erkrankt waren, mit Patienten, die an einer nachgewiesen Bakteriämie durch gramnegative Bakterien erkrankt waren. Ein signifikanter Unterschied bestand in der deutlich längeren Therapiedauer mit hochdosiertem Cytarabin bei Patienten mit Streptokokken Bakteriämien [29]. Tokuda et *al.* beschreibt 10 Fälle von Viridans-Streptokokken Infektionen neutropenischer Kinder mit hämatologischer Grunderkrankung. Bei sieben der zehn erkrankten Kinder bestand eine AML, welche mit hochdosiertem Cytarabin behandelt wurde. Dies weist auf ein erhöhtes Risiko für Viridans-Streptokokken Bakteriämie bei Hochdosistherapie mit Cytarabin hin. In acht der zehn Fälle konnten die Viridans-Streptokokken als *Streptococcus mitis* identifiziert werden [64]. Ein Bericht der CCG (Children's Cancer Group) aus dem Jahr 2000, der sich mit der Infektion durch Viridans-Streptokokken bei an AML erkrankten Kindern beschäftigt, identifiziert die Hochdosistherapie mit Cytarabin als Risikofaktor der Viridans-Streptokokken Bakteriämie [15]. Eine Studie von Okamoto et *al.* zeigte eine erhöhte kumulative Inzidenz der Viridans-Streptokokken Sepsis bei Behandlung mit dem Therapieschema AML97 (Akute myeloische Leukämie 1997), im Unterschied zur Behandlung mit dem Therapieschema AML91 (Akute myeloische Leukämie 1991). Der Grund dafür wurde mit der erhöhten Anzahl der Cytarabin Zyklen im Therapieschema AML97 (bis zu 5 Zyklen) im Vergleich zum Therapieschema AML91 (maximal 3 Zyklen) erklärt [47]. Eine Studie von Lehrnbecher et *al.* der 304 Patienten im Alter von 1 Monat bis 17 Jahre 9 Monate untersuchte, welche mit dem Therapieprotokoll AML-BFM 93 (Akute myeloische Leukämie - Berlin Frankfurt Münster 1993) behandelt wurden, zeigt eine signifikant erhöhte Inzidenz der Sepsis durch Viridans-Streptokokken bei Behandlungszyklen mit hochdosiertem Cytarabin (31 Episoden einer Viridans-Streptokokken Sepsis auf 358 Zyklen hochdosiertes Cyta-

rabin; 8,7%), im Gegensatz zu Behandlungszyklen mit Cytarabin in Standarddosierung (25 Episoden auf 550 Zyklen mit Cytarabin in Standarddosierung; 4,6%) [37]. Daher kann die Hochdosistherapie mit Cytarabin als ein Hauptrisikofaktor für die Infektion mit Viridans-Streptokokken bei Patienten mit hämatologischer Grunderkrankung gesehen werden [56].

1.5 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Cytarabin auf Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus mitis* zu untersuchen. Es wurden verschiedene Aspekte untersucht.

Hat *Streptococcus mitis* unter Einfluss von Cytarabin einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Viridans-Streptokokken?

Sind die untersuchten Bakterienstämme aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin ein Klon?

Weist *Streptococcus mitis* eine veränderte Proteinexpression unter Einfluss von Cytarabin auf und wenn ja, ist dies ein Hinweis für erhöhte Pathogenität von *Streptococcus mitis* in Anwesenheit von Cytarabin?

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Geräte

Airflow Controller	Waldner Laboreinrichtungen; Wangen
Analysewaage AG204	Mettler - Toledo GmbH; Giessen
Brutschrank 37°C, 5 % CO_2	Heraeus Instruments; Hanau
Brutschrank 37°C helvitron®t	Heraeus Instruments; Hanau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr; Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Heraeus Instruments; Hanau
Gelelektrophorese	
EPS 600 Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech; München
Gelapparat Perfect Blue	
Doppelgelsystem	peqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Model 543 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories
2219 Multitemp II	
Thermostatic Circulator	LKB Bromma; Sweden
pH-Fokussierung: PROTEAN IEF Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH;
Vakuumpumpe mit Kühlfalle	Helmut Saur Laborbedarf; Reutlingen
Kühlschrank 4°C	Bosch; Stuttgart

LaminAir HBB 2448	Heraeus Instruments; Hanau
LightCycler®PCR Analysesystem	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Mikrowelle	Bosch; Stuttgart
Milenia Kinetic Analyzer	Diagnostic Products Corporation; Los Angeles
Pulsfeldgelelektrophorese	
CHEF-DRIII Variable Angle System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Molecular Imager Gel Doc 2000 System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Photometer wavelength 450nm	GENE-TRAK System; USA
Ω 300 pH-Meter	Beckman Coulter; Krefeld
Photometer Ultrospec® 3000	Amersham Pharmacia Biotech; München
Pipetman®P	Gilson S.A.S.; France
Pipettierhilfe accu-jet®	PRO Brand GmbH & Co KG; Wertheim
Refrigerant R22 AF-10	Scotsman Ice Systems; Milan
Ribolyser: FastPrep FP120, BIO 101	MP Biomedicals, Heidelberg
Serologische Pipetten steril	VWR International; Darmstadt
Schüttel- und Mischgeräte	
Magnetrührer MR 3002	Heidolph Instruments; Schwabach
Polymax 1040	Heidolph Instruments; Schwabach
ThermoStat 5320	Eppendorf AG; Hamburg
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments; Schwabach
Wipptisch: WT12	Biometra GmbH; Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments; Hanau
Ultrazentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter; Krefeld
Rotor JA-10	Beckman Coulter; Krefeld
Bottles with Cap Assemblies	Beckman Coulter; Krefeld
Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech; Hanau

Waage KERN470	Decker Waagenbau
Wasserbad	Thermo Fischer Scientific Inc.; Ulm

2.1.1 Verwendete Software

Delta 2D	Decodon GmbH; Greifswald
Graph Version 4.3	freie Software
Statgraphics Centurion XV	Testversion

2.2 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon^{TM}	
Conical Centrifuge Tube 15 ml steril	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Conical Centrifuge Tube 50 ml steril	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Blotting paper	Whatmann International Ltd.; Dassel
Comboplate, 24-WELL	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Einmalskalpell steril	Dahlhausen Medizintechnik GmbH; Halberstadt
Filter Units 500 ml Capacity MF75^{TM}Series	Nalge Nunc International; NY
Gelelektrophorese	
Electrode Wicks	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Gel Drying Film	Promaga GmbH; Mannheim
Focusing Tray	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Ready Strip IPG Strips: 11cm, pH 3-10	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Rehydration / Equilibration Tray	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Glas Beads 150 - 220 microns acid-washed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München

Halbmikroküvetten PS	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Impfnadel gelb steril	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Impföse blau 10 μl	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Kimwipes® Lite 100	Kimberly Clark; Koblenz
Microplatte 96 WELL PS U-Boden Glasklar	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Millex® 33 mm Steril Filter Unit 0,22 μm	Millipore GmbH; Schwalbach
Mikrobank^{TM} Blue Colour Beads & Cap	Pro-Lab Diagnostics Inc.; UK
Mikrobank^{TM} Red Colour Beads & Cap	Pro-Lab Diagnostics Inc.; UK
Mikroröhre 2 ml mit Verschluss	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Mundschutz Grobstaub	VWR International; Darmstadt
Petrischalen 92/16	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Petrischalen 35/10	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Pipettenspitzen gelb	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Pipettenspitzen blau	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Reagenzgläser	SCHOTT AG; Mainz
Safeskin Satin Plus Powder Free	Kimberly Clark; Koblenz
Schottflaschen	SCHOTT AG; Mainz
Siebaufsatz grün	Bio-Rad Laboratories; München
Staining Boxes	Nalge Nunc International; NY
Standard-Reaktionsgefäss 1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Sterile Spritzen und Kanüle	
Injekt® Solo Sterile 20 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Omnifix® Solo Sterile 50 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Sterican® Sterile	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
UV-Präzisionsküvette aus Quarzglas	Hellma GmbH & Co. KG; Müllheim
Wattetupfer aus Baumwolle	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen

2.3 Substanzen

Acrylamid	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
Agarose	BioWhittaker Inc; USA
Ammoniumsulfat	Merck KgaA; Darmstadt
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Bad Homburg
APS	Merck KgaA; Darmstadt
BHI	Difco Laboratories; USA
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte	Bio-Rad Laboratories; München
Borsäure	Ballinckrodt Baker Inc.; NL
Brij 58	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
Bromphenolblau	Biomol Feinchemikalien GmbH; Hamburg
Catalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Columbia Agar	Oxoid Deutschland GmbH; Wesel
Coomassie Brilliant Blue G250 Pulver	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
Cytarabin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
DTT	Merck KgaA; Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Ethidiumbromid	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg

Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe
Cytarabin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Glucose	Merck KgaA; Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH; Darmstadt
H-Puffer	Bio-Rad Laboratories; München
H_3PO_4	Merck KgaA; Darmstadt
Harnstoff	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe
HBSS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
HCl	Merck KgaA; Darmstadt
Horseradish Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
HybProbe DNA Master Kit	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Iodacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
K_2HPO_4	Merck KgaA; Darmstadt
KCl	Merck KgaA; Darmstadt
KH_2PO_4	Merck KgaA; Darmstadt
Lysozyme	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Mutanolysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
NaCl	Merck KgaA; Darmstadt
NaOH 1N Lösung	Merck KgaA; Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
PBS	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe
Phenolrot	Merck KgaA; Darmstadt

Prestained SDS-PAGE Standard low range	Bio-Rad Laboratories; München
Primer Spneu-Up	Thermo Fischer Scientific Inc.; Ulm
Primer Spneu-R	Thermo Fischer Scientific Inc.; Ulm
Proteinase K	Hybaid AGS; Heidelberg
Roti®-Quant universal Kit	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe
Sarcosyl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Schafblut	Oxoid Deutschland GmbH; Wesel
SDS	SERVA Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
SMA1	Bio-Rad Laboratories; München
Sonde Spneu HP 3	TIB MOLBIOL GmbH; Berlin
Sonde Spneu HP 4a	TIB MOLBIOL GmbH; Berlin
Sonde Spneu HP 4b	TIB MOLBIOL GmbH; Berlin
TEMED	Merck KgaA; Darmstadt
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Todd Hewitt Buillon	Oxoid Deutschland GmbH; Wesel
Tris	Bio-Rad Laboratories; München
Wasserstoffperoxid 30 %ige Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg

2.4 Bakterienstämme

Tabelle 2.1 enthält die aus Blutkulturen der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin isolierten *Streptococcus mitis*- und *Streptococcus oralis*-Stämme. Aus 16 Blutkulturen, welche in einem Zeitraum von Januar 2002 bis August 2004 vierzehn Patienten abgenommen wurden, wurden achtzehn Bakterienstämme isoliert und für diese Arbeit näher untersucht. Aus zwei Blutkulturen (Nummer: 261714, 274877) wurden je ein *Streptococcus mitis* und ein *Streptococcus oralis* isoliert. Desweiteren stammen

die Blutkulturen 273033 und 276867 von einem Patienten mit *Streptococcus mitis*-Infektionen im Abstand von vier Monaten und die Blutkulturen 274810 und 280680 von einem Patienten mit *Streptococcus mitis*-Infektionen im Abstand von sechs Monaten.

Tabelle 2.2 zeigt *Streptococcus oralis*-Stämme, welche aus Blutkulturen der verschiedenen Abteilungen der Universitätsklinik Ulm isoliert wurden.

Tabelle 2.1: Bakterienstämme aus Blutkulturen der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin: Abkürzungen: STO = *Streptococcus oralis*, STT = *Streptococcus mitis*

Eingangs-Datum	Blutkulturnummer	Keim	intern vergebene Nummer
14.01.2002	253048	STT	14
13.03.2002	254876	STT	15
21.05.2002	257123	STT	9
16.07.2002	258850	STT	3
17.07.2002	258895	STT	12
31.10.2002	261714	STT	11
31.10.2002	261714	STO	10
10.11.2003	273033	STT	5
19.01.2004	274810	STT	1
21.01.2004	274877	STT	2
21.01.2004	274877	STO	18
31.01.2004	275183	STT	4
28.03.2004	276867	STT	13
07.06.2004	279076	STT	16
25.06.2004	279683	STT	17
23.07.2004	280680	STT	6
09.08.2004	281227	STT	7
27.08.2004	281822	STT	8

Tabelle 2.2: Bakterienstämme aus Blutkulturen der Universitätsklinik Ulm: *Streptococcus oralis*-Stämme aus diversen Abteilungen der Universitätsklinik Ulm; Abkürzungen AN = Anästhesie, ME = Innere Medizin , UR = Urologie

Eingangs-Datum	Blutkulturnummer	Ursprungs-Abteilung
01.02.2002	253572	UR
18.04.2002	256046	UR
06.06.2002	257593	AN
21.06.2002	258067	ME
22.08.2002	259837	UR
19.11.2002	262207	ME
31.05.2003	268083	ME
30.06.2003	269054	ME
08.07.2003	269261	ME
08.10.2003	272057	ME
25.10.2003	272497	ME
20.02.2004	275751	ME
13.03.2004	276451	ME
22.03.2004	276693	ME
04.12.2004	284861	ME

2.5 Lösungen

2.5.1 Allgemeine Lösungen

Columbia-Blut-Platten

39 g Columbia Agar in 1000 ml aqua bidest lösen

autoklavieren

50 ml Schafblut

PBS

pH 7,3

10x PBS

2,0 g KCl

2,0 g KH_2PO_4

80,0 g NaCl

21,6 g Na_2HPO_4

ad 1000 ml aqua bidest

TES

pH 8,15

6,05 g Tris

1,85 g EDTA

2,92 g NaCl

ad 1000 ml aqua bidest

THY-Flüssigmedium

36,4 g Todd Hewitt Buillon

5 g Yeast Extract

ad 1000 ml aqua bidest

2.5.2 Lösungen für Coomassie-Färbung

Fixierungslösung

250 ml Ethanol

7 ml H_3PO_4 85 %

ad 500 ml aqua bidest

Lösung 2

170 ml Methanol

85 g Ammoniumsulfat

7 ml H_3PO_4 85 %

ad 500 ml aqua bidest

Färbelösung

170 ml Methanol

0,330 g Coomassie Brilliant Blue G250

85 g Ammoniumsulfat

7 ml H_3PO_4 85 %

ad 500 ml aqua bidest

2.5.3 Lösungen für 2D-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung

29,3 g Acrylamid

0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid

ad 100 ml aqua bidest

Ammoniumpersulfatlösung

40 % Ammoniumpersulfatlösung

400 mg Ammoniumpersulfat

ad 1 ml aqua bidest

Äquilibrierungspuffer

72 g Harnstoff

60 g Glycerin

4 g SDS

6,6 ml Trenngelpuffer

ad 200 ml aqua bidest

Lysispuffer2

42 g Harnstoff

15,2 g Thioharnstoff

2 g CHAPS

1 g DTT

2 ml Bio-Lyte pH 3-10

in ca. 90 ml aqua bidest lösen

ad 100 ml aqua bidest

Lösung in 1 ml Portionen bei -80°C lagern.

Rehydratisierlösung für Lysispuffer 2

18 g Harnstoff

7,6 g Thioharnstoff

100 mg DTT

500 mg CHAPS

313 μl Bio-Lyte pH 3-10

ad 50 ml aqua bidest

SDS-Lösung

10 % SDS-Lösung

10 g SDS

ad 100 ml aqua bidest

Elektrodenpuffer

pH 8,3

10x Elektrodenpuffer

30,3 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

ad 1000 ml aqua bidest

Trenngelpuffer

pH 8,8 (mit HCl titrieren)

90,83 g Tris in 400 ml aqua bidest auflösen

ad 500 ml aqua bidest

12 % SDS-Gel

25,5 ml aqua bidest

18,75 ml Trenngelpuffer

0,75 ml 10 % SDS-Lösung

37,5 μl TEMED

112, 5 μl APS 40 %

30 ml Acrylamid

Überschicht-Agarose

0,5% Agarose

0,25 g Agarose

Spatelspitze Bromphenolblau

ad 50 ml 10x Elektrodenpuffer

2.5.4 Puffer und Stammlösungen für PFGE

EDTA

0,5 M EDTA

pH 8,0

93,05 g EDTA

400 ml aqua bidest zugeben, unter Rühren ca. 25 ml 10 N NaOH zugeben und pH 8,0 einstellen.

NaOH

80 g NaOH in 160 ml steriles aqua bidest unter Kühlung lösen

ad 200 ml steriles aqua bidest

Proteinase K

100 mg Proteinase K in 5 ml sterilem aqua bidest lösen in 300-400 μl Portionen bei -20°C einfrieren

10 % Sarcosyl

10 g Sarcosyl in 90 ml sterilem aqua bidest bei 50 - 60°C unter leichtem Rühren lösen

20 % SDS

20 g Sodium Dodecyl Sulfat in 80 ml sterilem aqua bidest unter leichtem Rühren erwärmen

Tris-Puffer

pH 8,0 mit HCl einstellen
1 M Tris
121,1 g Tris in 650 - 700 ml aqua bidest lösen
ad 1000 ml aqua bidest

1 % Agarose

Agarose in 1x TBE
1 g in 100 ml TBE schmelzen

2 % Agarose

100 ml 2 % Agarose für Disks:
2 g Agarose in 0,5x TE-Puffer schmelzen
pro 100 ml: 50 μl SDS

Waschpuffer

10 ml Tris 100 mM, pH 8,0
500 μl $MgCl_2$ 5 mM
ad 100 ml mit sterilem aqua bidest

EC-Puffer

pH 7,5
6 mM Tris
1 M NaCl

100 mM EDTA pH 8

0,5 % Brij 58 = Polyoxythylene 20 ethyl Äther

0,2 % Deoxycholate = Deoxycholic Acid, Sodium-Salt

0,5 % Sarcosyl = N-Lauroylsarkosin, Sodium-Salt

mischen, pH einstellen

ad 500 ml aqua bidest

Lysepuffer

pH 8,0

25 ml 1 M Tris

50 ml 0,5 M EDTA

50 ml 10% Sarcosyllösung

ad 500 ml aqua bidest

CSB-Puffer

100 mM Tris / 100 mM EDTA, pH 8,0

10 ml 1 M Tris pH 8,0

20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 100 ml aqua bidest

Restriktionspuffer

42 μl aqua bidest

5 μl H-Puffer 10x (wird mitgeliefert)

3 μl Enzym (hier: SMA1)

0,5 μl BSA 100x (wird mitgeliefert)

TBE-Puffer

pH 8,3

10x TBE-Puffer

121,1 g Tris 1 M

61,8 g Borsäure 1 M

53,7 g EDTA

ad 1000 ml aqua bidest

0,5x TBE Laufpuffer

10x TBE mit aqua bidest 1:20 verdünnen

TE-Puffer

pH 8,0

10 ml 1 M Tris

2 ml 0,5 M EDTA

ad 1000 ml aqua bidest

2.5.5 Lösungen für Wasserstoffperoxid-Nachweis

BHI-Flüssigmedium

37 g BHI

ad 1000 ml aqua bidest

Catalase

37,3 mg Catalase für 50 ml entspricht 1000 U/ml

Cytarabin-Stock

10 mg Cytarabin in 1 ml PBS

Meerrettich-Peroxidase

Meerrettich-Peroxidase-Stock

1 mg Meerrettich-Peroxidase in 10 ml Peroxid-Puffer entspricht 298 units.

38,6 μl Meerrettich-Peroxidase-Stock für 25 ml Peroxid-Puffer

Peroxid-Puffer

pH 7,4

für 1 l:

870,95 g K_2HPO_4 (5 mM)

136,09 g KH_2PO_4 (1 mM)

8,18 g NaCl (140 mM)

90,08 mg Glucose (0,5 mM)

Bestandteile in 1 l Ampuwa lösen

Steril filtrieren

Peroxid-Puffer plus

enthält 10 mM Glucose

pH 7,4

für 1 l:

870,95 g K_2HPO_4 (5 mM)

136,09 g KH_2PO_4 (1 mM)

8,18 g NaCl (140 mM)

1,8 g Glucose (10 mM)

Bestandteile in 1 l Ampuwa lösen

Steril filtrieren

Phenolrot

163,01 mg Phenolrot für 1 l Peroxid-Puffer entspricht 0,46 mM

Wasserstoffperoxid

1 Molare Lösung

887 μl Peroxid-Puffer plus

113 μl 30 % Wasserstoffperoxid Lösung

10 mM Lösung

990 μl Peroxid-Puffer plus

10 μl 1 Molare Lösung

1 mM Lösung

900 μl Peroxid-Puffer plus

100 μl 10 mM Lösung

2.6 Reihenverdünnungstest

Zur Testung eventueller Wachstumsvorteile in Cytarabin von *Streptococcus mitis* gegenüber anderen Viridans-Streptokokken wurde ein Reihenverdünnungstest mit Konzentrationen von 0 bis 256 mg/l Cytarabin durchgeführt. Es wurden 16 *Streptococcus mitis*-Stämme der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (siehe Tabelle 2.1) und 17 *Streptococcus oralis*-Stämme aus verschiedenen Abteilungen der Universitätsklinik Ulm (siehe Tabellen 2.1 und 2.2) getestet.

2.6.1 Vorbereitung

Zur Herstellung einer Stocklösung Cytarabin wurden 25,6 mg Cytarabin mit der Feinwaage abgewogen und in 1 ml PBS gelöst. Dieser Stock wurde für die gesamte Testreihe angewandt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.
Vor Durchführung des Reihenverdünnungstests wurden von den zu testenden Stämmen Übernacht-Kulturen angelegt. Dafür wurden pro Stamm 5 ml THY in ein Reagenzglas vorgelegt, mit einer Einmal-Impfnadel mehrere Bakterienkolonien von einer Columbia-Blutagarplatte des entsprechenden Stamms in das Reagenzglas überführt und dieses kurz gevortext. Die so beimpften Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 angezüchtet.

2.6.2 Reihenverdünnungstest

Der Versuch wurde aufgrund der Toxizität von Cytarabin, soweit möglich, mit Einmal-Materialien, welche über den Autoklaviermüll entsorgt werden konnten, durchgeführt. Es wurden daher 15 ml Kunstsoff-Reaktionsgefäße verwendet.
Die Reihenverdünnung wurde mit allen Bakterienstämmen nach dem in der Tabelle 2.3 aufgezeigten Schema durchgeführt. Es wurde mit der höchsten Konzentration begonnen. Nach jedem Pipettiervorgang wurden, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette, die Lösungen gut miteinander vermischt bevor die nächste Verdünnung

Tabelle 2.3: Pipettierschema Reihenverdünnungstest: Abkürzungen: AraC = Cytarabin, AraC-Stock = Cytarabin-Stocklösung(25,6 mg/ml), Konz. = Konzentration, mg/l = milligramm/liter, μl = mikroliter, RG = Reaktionsgefäß, THY = Todd Hewitt Yeast Broth, ÜN = Übernacht

RG-Nummer	Konz. AraC (mg/l)	μl THY	Verdünnung	μl ÜN-Kultur
11	0	1000	0	0
10	256	1980	20 μl AraC-Stock	10
9	128	1000	1000 μl RG 10	10
8	64	1000	1000 μl RG 9	10
7	32	1000	1000 μl RG 8	10
6	16	1000	1000 μl RG 7	10
5	8	1000	1000 μl RG 6	10
4	4	1000	1000 μl RG 5	10
3	2	1000	1000 μl RG 4	10
2	1	1000	1000 μl RG 3	10
1	0	1000	0	10

hergestellt wurde. Die Zugabe der Übernacht-Kultur erfolgte nach Fertigstellung der Verdünnungsreihe. 1000 μl aus Reaktionsgefäß 2 wurden verworfen, so dass der Test mit einem Gesamtvolumen von 1000 μl durchgeführt wurde. Reaktionsgefäß 11 diente als Negativkontrolle, Reaktionsgefäß 1 als Positivkontrolle. Der gesamte Test wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Zugabe der Übernacht-Kultur wurde jedes Reaktionsgefäß kurz gevortext.

2.6.3 Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte nach bebrüten bei 37°C und 5 % CO_2 über Nacht im Brutschrank durch Sichtkontrolle. Nach aufschütteln der Proben wurde eine starke Trübung als gutes Wachstum (++), eine leichte Trübung als Wachstum (+) und eine klare Lösung als kein Wachstum (0) interpretiert. Bei jedem Bakterienstamm wurde sowohl eine Positivkontrolle (Wachstum der Bakterien ohne Anwesenheit von Cytarabin) als auch eine Negativkontrolle (Nährlösung ohne Keim und ohne Cytarabin) mitgeführt. Der Test wurde nur dann gewertet, wenn die Positivkontrolle bewachsen und die Negativkontrolle nicht kontaminiert war.

2.7 Nachweis des Autolyse Gens *lytA*

Nachweis des Autolyse Gens *lytA* in *Streptococcus mitis* mittels realtime-PCR im Light-Cycler. Es wurden alle 18 Bakterienstämme aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin untersucht (siehe Tabelle 2.1).

2.7.1 Isolierung chromosomaler DNA

Die Voraussetzung zur Durchführung des LightCycler-Versuches war die Isolierung chromosomaler DNA.

Vorbereitung

Pro Bakterienstamm wurde eine Übernacht-Kultur hergestellt. Dazu wurden 5 ml THY in Reagenzgläser vorgelegt, mit einer Einmal-Impfnadel mehrere Bakterienkolonien eines Stammes in das entsprechende Reagenzglas überführt und kurz gevortext. Die Reagenzgläser wurden dann über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Durchführung

Die folgenden Vorgänge wurden mit allen Bakterienstämmen auf dieselbe Weise durchgeführt. Die 5 ml Übernacht-Kultur wurde kurz gevortext, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml TE resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 8.000 U/Min für 1 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 300 μl TES resuspendiert. Es wurden 100 μl Lysozym und 10 μl Mutanolysin zugegeben und für circa 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 22 μl 10% SDS und 15 μl Proteinase K zugegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt und 2 bis 3 Stunden bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 100 μl gesättigtes NaCl zugegeben und das Eppendorf-Reaktionsgefäß kurz gevortext. Es wurde für 10 Min bei 13.000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand welcher die DNA enthielt wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nun wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25/24/1) zugegeben, alles gut gemischt und für 4 Min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die DNA, die untere organische Phase die Proteine. Die obere Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang wiederholt. Um die Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24/1) zugegeben, alles gut gemischt und erneut für 4 Min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die obe-

re Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Hier erfolgte die Ausfällung der DNA. Dafür wurden 2 - 2,5 Volumen Ethanol (gekühlt bei -20°C) dazu pipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Die DNA zeigte sich als feiner Faden. Sie wurde 5 Min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und das Ethanol mit der Pipette entfernt. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in 100 μl Tris langsam gelöst und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch. Die DNA wurde mit aqua bidest im Verhältnis 1:200 verdünnt (5 μl DNA in Tris gelöst mit 995 μl aqua bidest). Der Photometer wurde mit 1000 μl aqua bidest auf Null gestellt. Die Messung erfolgte anschließend, mit der aus jedem einzelnen Bakterienstamm gefällten DNA, bei 260 nm in der Quarzglasküvette. Die gemessene Absorption wurde zur Berechnung der Konzentration in die Formel $Absorption * 200 * 50 = X(mg/l)$ eingesetzt, wobei 200 der Verdünnung und 50 dem DNA-Koeffizienten entspricht.

2.7.2 LightCycler

Es wurde das Protokoll zum Nachweis von *lytA* in *Streptococcus pneumoniae* nach McAvin et *al.* in abgewandelter Form verwendet [43]. Dazu wurden je Bakterienstamm 2 μl DNA-Menge eingesetzt. Von den Primern Spneu-Up (5'-TGG AAT GCT GAG ACC TATG) (nach PD Dr. Udo Reischl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) und Spneu-R (5'-TGT TTG CTT GGT TAT TCG TGCA) (nach McAvin [43]) wurden je 10 pmol dazu pipettiert. Als Sonden wurden Spneu-HP-3 (CAG GTT TGC CGA AAA CGC TTG ATA CA-[FL]), Spneu-HP-4a ([Red640]-AGT TTA GCT GGA ATT AAA ACG CAC GA) und Spneu-HP-4b ([Red705]-GAC TTG GCA GGT ATC AAA ACG CAT GAA) eingesetzt. Dabei handelt es sich um Sonden nach McAvin et *al.* welche von Reischl (PD Dr. Udo Reischl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) ab-

gewandelt wurden. Benötigt wurden je 3 μM. Eine Negativ- und eine Positivkontrolle wurden mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler®Software.

2.8 Pulsfeldgelelektrophorese

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese wurde untersucht ob die aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin isolierten Bakterienstämme (siehe Tabelle 2.1) ein Klon sind. Es wurde die Methode von Murray et *al.* [44] modifiziert nach Poutanen et *al.* [51] in abgewandelter Form verwendet.

2.8.1 Vorbereitung

Zum Schutz der DNA vor mechanischer Zerstörung durch das Pipettieren wurden Zellsuspensionen der einzelnen Bakterienstämme hergestellt und in Agarose-Blöckchen (im weiteren Disks genannt) gegossen. Dazu wurde 2 % Agarose verwendet.
Zur Herstellung der Zellsuspension wurden ausreichend mit Bakterien bewachsene Blutagar-Platten benötigt. Pro Stamm wurde eine Blutagar-Platte großzügig mit Bakterienkolonien beimpft und bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden mit einem Wattestäbchen von den Platten genommen und in 2 ml CSB-Puffer suspendiert bis eine OD_{450} von 0,65 +/- 0,01 erreicht war.
Die 2 % Agarose wurde im heißen Wasserbad flüssig gehalten. Pro Bakterienstamm wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 500 μl Zellsuspension und 500 μl 2 % Agarose gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend in den Disk-Gießstand pipettiert und bis zur Aushärtung der Agarose für circa eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Pro Bakterienstamm wurden so 6 Disks hergestellt.

2.8.2 Durchführung der Elektophorese

In eine 24-Well-Platte wurde je 1 ml TE-Puffer vorgelegt und je Vertiefung 6 Disks eines Bakterienstammes aus dem Disk-Gießstand überführt. Die im folgenden beschriebenen

Schritte wurden je Bakterienstamm durchgeführt. Es wurde 50 μl Lysozym (20 mg/ml) und 18 μl Mutanolysin, gelöst in 1 ml EC-Puffer, in die Vertiefungen pipettiert und für 5 Stunden bei 37°C unter ständigem schütteln inkubiert. Der Puffer wurde abpipettiert und die Disks 2x in 1 ml TE-Puffer gewaschen. Die Disks wurden nun in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Pro Bakterienstamm wurde ein Reaktionsgefäß verwendet. Es wurden 5 ml Lysepuffer und 20 μl Proteinase K dazu pipettiert und im 50°C Wasserbad unter ständigem schütteln über Nacht (circa 18 Stunden) inkubiert. Auf das Reaktionsgefäß wurden für die folgenden Wasch-Schritte zur einfacheren Handhabung Siebaufsätze geschraubt, so konnten die Flüssigkeiten ausgeschüttet werden ohne die Disks zu beschädigen. Die Disks wurden zweimal mit 15 ml 50°C warmem aqua bidest für 10 Min und zweimal 10 Min mit 15 ml 50°C warmem TE-Puffer gewaschen. Um die Disks für die weitere Bearbeitung wieder etwas zu festigen wurde nach dem letzten Wasch-Schritt 5 ml gekühlter TE-Puffer zu den Disks gegeben.

Für die PFGE wurde nur ein halber Disk pro Bakterienstamm benötigt, die restlichen Disks wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 750 μl TE-Puffer bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das halbe Disk wurde mit 250 μl TE-Puffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Puffer abpipettiert. Im folgenden wurde das Disk zur Vorbereitung der Restriktion mehrfach mit Waschpuffer gewaschen. Im ersten Schritt wurden 500 μl des Waschpuffers zugegeben und sofort wieder abpipettiert. Als nächstes wurden die Disks dreimal für eine Stunde in 1 ml Waschpuffer geschüttelt. Für die Restriktion wurden die Disks in 50 μl Restriktionspuffer (ohne Enzym) (Restriktionspuffer/aqua bidest 1/10) für eine Stunde bei 4°C inkubiert und der Puffer anschließend abpipettiert. Zur Restriktion musste das Disk vollständig bedeckt werden. Es wurden circa 50 μl Restriktionspuffer (mit Enzym) zum Disk pipettiert und dieses für eine halbe Stunde bei 4°C vorinkubiert. Die Restriktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Für die PFGE wurde 1 % Agarose hergestellt und für eine Stunde bei 50°C ruhen gelassen. Die Gießvorrichtung für die PFGE wurde mit Alkohol gereinigt und mittels Wasserwaage waagerecht eingestellt. Der Kamm auf welchem 1/3 des Disks positioniert

war, wurde eingespannt. In der ersten und letzten Bahn wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Disks wurden mit 30-50 μl 1 %Agarose überdeckt, diese wurde nach 1-2 Min. fest, so wurden die Disks am Kamm festgeklebt um beim Gießen des großen Gels nicht abzurutschen. Danach wurde das 1 % Agarose-Gel vorsichtig in die Gießvorrichtung gegossen und für eine halbe Stunde stehen gelassen um fest zu werden. Die PFGE-Kammer wurde in 2,5 l TBE-Puffer gefüllt und das Programm eingestellt (siehe Tabelle 2.4). Nach festwerden des Gels konnte der Kamm aus der Gießvorrichtung

Tabelle 2.4: Programm der Pulsfeldgelelektrophorese: Abkürzungen: cm = Zentimeter, h = Stunde, s = Sekunde, Temp. = Temperatur, V = Volt, °C = Grad Celsius

Laufzeit (h)	Pulszeiten (s)	Spannung (V)	Temp. (°C)	Block
20	10-50	240 (entspricht 6 V/cm)	14	Block 1
0	Ende der Pulsierung			Block 2

entfernt werden, die Disks blieben im Gel hängen. Die Löcher, welche der Kamm im Gel hinterlassen hatte wurden mit 1 % Agarose geschlossen. Es dürfen keine Luftblasen entstehen. Die Platte mit dem gegossenen Gel wurde nun in den Positionsrahmen der PFGE-Kammer gelegt. Die Kammer musste sich eine Stunde kalibrieren, dann konnte das Programm gestartet werden. Nach Beendigung der PFGE wurde das Gel für 40 Min in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend zweimal in aqua bidest gewaschen. Das Gel wurde in der Photo-Kammer positioniert und digital abphotografiert.

2.8.3 Auswertung

Tenover et *al.* beschrieben eine Methode für einen Ansatz von < 30 Bakterien-Isolaten, dabei werden die Fragmente der Isolate paarweise verglichen und die Anzahl der unterschiedlichen Banden bestimmt. Je nach Anzahl der ungleichen Banden definierten Tenover et al. die vier Kategorien nicht-unterscheidbar, nah-verwandt, evtl. verwandt und nicht-verwandt [63].

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung von Bandenmustern ist das berechnen

von Koeffizienten. Auch hierbei werden die Isolate paarweise verglichen. Der Koeffizient berechnet sich aus der Anzahl der übereinstimmenden Banden und der Gesamtheit der verglichenen Banden, woraus sich kontinuierlich verteilte Beziehungen der einzelnen Isolate ergeben [61, 30].

2.9 Proteom

Proteom bezeichnet die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Organismus oder eines Kompartiments zu einem bestimmten Zeitpunkt. Eine Methode zur Untersuchung des Proteoms ist die 2D-Elektrophorese, dabei werden die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht, aufgetrennt [46].

In einem ersten Schritt wird das Proteom eines Bakterienstammes mit und ohne Einfluss von Cytarabin gewonnen (siehe Methode 2.9.1). Es folgt die Auftrennung des Proteoms mittels 2D-Gelelektrophorese (siehe Methode 2.9.2). Die so hergestellten Gele werden gefärbt (siehe Methode 2.9.3) um die Proteine sichtbar zu machen. Nun erfolgt eine vergleichende Auswertung der Gele mit Hilfe einer Computer Software. Interessante Spots werden aus dem Originalgel ausgeschnitten. Das in dem Spot enthaltene Protein wird mittels massenspektrometrischer Verfahren und Abgleich mit Proteom-Datenbanken identifiziert (siehe Methode 2.9.4).

2.9.1 Gesamtproteingewinnung

Fällung des Proteoms aus einem *Streptococcus mitis*-Stamm. Für diesen Versuch wurde der Bakterienstamm mit der intern vergebenen Nummer 17 (siehe Tabelle 2.1) ausgewält. Die Gewinnung des Proteoms wurde sechsmal durchgeführt, dreimal ohne Cytarabin und dreimal mit Cytarabin um den Einfluss von Cytarabin auf die Proteinexpression von *Streptococcus mitis* untersuchen zu können.

Vorbereitung

Es wurde eine Übernacht-Kultur des ausgewählten Bakterienstammes hergestellt.

Für die Untersuchung des Proteoms ohne Einfluss von Cytarabin wurden von einer Blutagarplatte mit einer Impfnadel mehrere Bakterienkolonien in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml THY-Flüssigmedium inokuliert.

Für die Herstellung einer Übernacht-Kultur mit Cytarabin wurden den 10 ml THY-Flüssigmedium 3,9 μl eines Cytarabin-Stockes (25,6 mg/ml) zugegeben. Dies entspricht einer Konzentration von 10 mg/l Cytarabin. Es wurden dann mit einer Impfnadel mehrere Bakterienkolonien von derselben Blutagarplatte in dieses Reaktionsgefäß überführt und einmal kurz gevortext.

Anschließend wurde die Nährmedien über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Durchführung

Pro Ansatz (mit/ohne Cytarabin) wurde exakt gleich vorgegangen.

Die 10 ml Übernacht-Kultur wurde erneut gevortext und anschließend in 500 ml THY-Flüssigmedium überführt, dieses wurde bei 37°C im Brutschrank bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Zur Unterbrechung des Wachstums wurde die Probe bei 4°C für 10 Minuten mit 6.000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mehrmals mit 5 ml Tris-Puffer gewaschen und jeweils bei 3.000 U/Min für 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Tris-Puffer aufgenommen, bei 13.000 U/Min für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer2 resuspendiert und in Ribolyser-Gefäßen, welche 0,5 g Glaskugeln enthielten, überführt. Der Ribolyser-Vorgang wurde 10 mal für 20 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurden die Ribolyser-Gefäße bei 13.000 U/Min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Proteom enthält (im weiteren als Proteinlösung bezeichnet), wurde abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -20°C eingefroren.

Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der gewonnen Proteine erfolgte mit Hilfe des Roti®-Quant universal Kit durch photometrische Bestimmung. Es wurde eine Eichgerade mittels bekannter Konzentrationen bovinem Serumalbumins erstellt.

Zur Proteinbestimmung wurden 199 μl aqua bidest mit 1 μl der aufgetauten Proteinlösung gemischt und mit 800 μl des universal Kits auf 1000 μl aufgefüllt. Diese Mischung wurde mit den sechs zuvor gewonnen Proteinlösungen hergestellt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Der Photometer wurde mit 1000 μl aqua bidest auf Null gestellt. Anschließend wurde jede Probe bei einer Wellenlänge von 590 nm und 450 nm gemessen. Hieraus wurde der Quotient OD_{590}/OD_{450} errechnet. Dieser Quotient wurde in die aus der Eichgeraden ermittelten Formel ($y = aX + b$) eingesetzt, und die Proteinkonzentration in μg/μl berechnet.

2.9.2 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Es wurde eine isoelektrische Fokussierung in einem immobilisierten pH-Gradienten (im weiteren als IPG-Strip bezeichnet) durchgeführt.

In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung mittels einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Molekülgröße. Die Porengröße des Polyacrylamidgels ist abhängig vom Verhältnis Polyacrylamid zu Methylenbisacylamid.

Um einen optimalen Proteintransfer von der ersten zur zweiten Dimension zu gewährleisten muss in einem Zwischenschritt eine Äquilibrierung der IPG-Strips erfolgen.

Isoelektrische Fokussierung

Für die Auftrennung des gesamten Proteoms wurden IPG-Strips der Länge 11 cm mit einem pH-Gradienten von 3 - 11 verwendet. Je Proteinlösung wurde ein IPG-Strip benötigt. Diese wurden bei -20°C aufbewahrt und mussten vor Beginn der Fokussierung rehydratisiert werden. Zuerst wurden die sechs eingefrorenen Proteinlösungen langsam

aufgetaut. Für die anschließend geplante Färbung des Gels mit Coomassie G250 wurde eine Proteinmenge von 120 μg pro Gel benötigt. Das Gesamtvolumen zur Rehydratisierung der IPG-Strips betrug 200 μl. Anhand der bekannten Proteinkonzentrationen (siehe Tabelle 3.3) wurden nun die benötigten Mengen Proteinlösung und Rehydratisierungspuffer berechnet und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die pipettierten Mengen sind in Tabelle 2.5 aufgezeigt.

Tabelle 2.5: Pipettierschema isoelektrische Fokussierung: Menge Proteinlösung und Rehydradisierungspuffer bei einer Geamtproteinmenge von 120 μl und einem Gesamtvolumen von 200 μl. Die Probennummer leitet sich aus der Reihenfolge der Herstellung der Proteinlösungen ab. Abkürzungen: A = mit Cytarabin, μl = mikroliter

Probennummer	Proteinlösung	Rehydratisierungspuffer
1	11,15 μl	190 μl
2	10,31 μl	190 μl
3	5,61 μl	195 μl
1A	6,98 μl	195 μl
2A	19,29 μl	181 μl
3A	19,93 μl	181 μl

Jede Probe wurde in einer Bahn des Focusing Tray luftblasenfrei an den unteren Rand pipettiert. Dann wurden nacheinander von den einzelnen IPG-Strips mit einer Pinzette die Plastikdeckschicht entfernt, die IPG-Strips mit der Gelschicht nach unten luftblasenfrei in die entsprechende Bahn des Focusing Tray plaziert und für circa eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurden die IPG-Strips mit je 1 ml Mineralöl überschichtet, der Focusing Tray in den PROTEAN IEF Cell eingesetzt und das Programm zur aktiven Rehydratisierung gestartet (12 Stunden bei 50 Volt). Danach konnte mit der Fokussierung begonnen werden. Dazu wurde der Focusing Tray aus dem Gerät entnommen und mit aqua bidest angefeuchtete Filterpapierstreifen (Electrode Wicks) auf Höhe der Metallstreifen unter die IPG-Strips gelegt. Der Focusing Tray wurde nun

wieder in den PROTEAN IEF Cell eingesetzt und das Programm zur Fokussierung gestartet (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Fokussierungsprogramm für IPG-Strips der Länge 11 cm. Abkürzungen: cm = Zentimeter, h = Stunde, IPG = immobilisierter pH-Gradient, V = Volt, Vh = Voltstunde

150 V	1 h
300 V	1 h
1000 V	1 h
bis 8000 V	1 h
8000 V	24 000 Vh
500 V	∞

Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Focusing Tray aus dem Gerät entnommen, die IPG-Strips in das Rehydration / Equilibration Tray überführt und bei -70°C aufbewahrt.

SDS-Polyacrylamidgel-Herstellung

In der vertikalen Gelvorrichtung konnten zwei Gele parallel gegossen und die Elektrophorese durchgeführt werden. Der Vorgang, je zwei SDS-Polyacrylamidgele zu gießen und die Gelelektrophorese durchzuführen, wurde dreimal auf dieselbe Art wiederholt.

In einem ersten Schritt wurde der Gelapparat bestehend aus einem Gießstand, vier Glasplatten und vier Spacer, welche zwischen den Glasscheiben platziert wurden, aufgebaut und mit Hilfe der Verschraubung am Gießstand abgedichtet. Um Verunreinigungen der Gele mit Proteinen aus der Umgebung zu vermeiden wurde der gesamte Vorgang mit Handschuhen durchgeführt und die Glasscheiben vorher mit Alkohol gereinigt. Die Dichtigkeit wurde mit aqua bidest geprüft. In einem zweiten Schritt wurde das 12%-SDS-Gel nach Rezept hergestellt und mit einer Stabpipette zwischen die Glasscheiben gegossen. Zum Schutz vor Austrocknung wurden beide Gele mit aqua bidest überschichtet und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Gele wurden zur Auspolymeri-

sation über Nacht im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Äquilibrierung

Zur Äquilibierung wurden direkt vor der Gelelektrophorese jeweils zwei der eingefrorenen IPG-Strips zuerst in 100 mg DTT, gelöst in 10 ml Äqulibrierungspuffer, 15 Min inkubiert und anschließend in 481 mg Iodacetamid, gelöst in 10 ml Äqulibrierungspuffer, 15 Min inkubiert.

Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde der 10x Elektrodenpuffer 1:10 verdünnt. Es wurden etwa 1,7 l 1x Elektrodenpuffer benötigt.

Für jedes Gel wurden 2 μl SDS-PAGE Standard auf einen halben Electrode Wick pipettiert und während der Vorbereitungszeit im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

Um den IPG-Strip an das SDS-Polyacrylamidgel zu heften und gleichzeitig eine Möglichkeit zur Kontrolle zu haben, wie weit fortgeschritten die Gelelektrophorese ist, wurde eine blaugefärbte Überschicht-Agarose hergestellt und bei 55°C im Wasserbad bis zur Verwendung bereitgestellt.

Das Wasser wurde aus dem Gießstand abgegossen und dieser in die Gelkammer eingesetzt. Die Gelkammer wurde bis zur Markierung mit 1x Elektrodenpuffer gefüllt. Mit einer Spritze mit gebogener Kanüle wurden die Luftblasen, welche sich nach einfüllen des Puffers an der Unterseite der Gele zwischen den Glasscheiben gebildet hatten entfernt. Nun erfolgte das Bestücken beider Gele mit je einem äqulibrierten IPG-Strip, einem der vorbereiteten Electrode Wicks und der blaugefärbten Überschicht-Agarose. Hierzu wurde ein IPG-Strip zuerst kurz in den Elektrodenpuffer getaucht und dann mit der Gelseite zur Mitte zwischen die Glasscheiben auf dem Gel platziert. Der Electrode Wick wurde direkt neben den IPG-Strip geschoben und beides mit 1 ml blaugefärbter Überschicht-Agarose abgedeckt. Nun wurde der Raum zwischen den beiden Gelen mit dem restlichen Elektrodenpuffer bis zum oberen Rand der Glasscheiben aufgefüllt

und die Kühlung angeschlossen. Die Gelelektrophorese wurde die erste halbe Stunde mit 12 Watt pro Gel und für die verbleibende Zeit mit 24 Watt pro Gel durchgeführt. Die Gelelektrophorese ist beendet wenn die blaue Farbe aus der Agarose bis an den unteren Rand des Gels gelaufen ist. Der Puffer wurde nach Beendigung der Gelelektrophorese abgegossen und die Gläser zwischen denen sich die SDS-Polyacrylamidgele befinden vorsichtig voneinander getrennt. Um die obere Glasplatten abzulösen wurden die Spacer vorsichtig angehoben, das Gel wurde dann in einer mit Fixierungslösung vorbereiteten Wanne durch vorsichtiges auf und ab der verbleibenden Glasplatte von dieser abgelöst.

2.9.3 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden einzeln in Plastikwannen gefärbt. Pro Gel wurden 250 ml der Lösungen benötigt. Die Färbelösung wurde einen Tag vor der Färbung hergestellt und über Nacht auf dem Magnetrührer gemischt. Vor der Färbung des Gels wurde die Färbelösung durch doppelt geschichtetes Filterpapier gefiltert, um Reste ungelösten Coomassie Pulvers zu entfernen.

Direkt nach der Gelelektrophorese wurde jedes Gel in eine Wanne mit Fixierungslösung überführt und über Nacht darin inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fixierungslösung vorsichtig abgegossen und das Gel für eine Stunde in Lösung 2 auf die Färbung vorbereitet, auch diese Lösung wurde dann vorsichtig abgegossen. Das Gel wurde anschließend für fünf Tage in der Färbelösung geschwenkt. Nach fünf Tagen wurde die Färbelösung vorsichtig abgegossen, das Gel zweimal für circa 10 Minuten mit aqua bidest gewaschen und eine halbe Stunde lang mit 5 %iger Glycerin-Lösung stabilisiert.

Als nächstes wurden die Gele getrocknet und in Folie eingeschweißt. Auch dieser Vorgang wurde mit jedem Gel einzeln auf dieselbe Weise durchgeführt. Zuerst wurden je zwei Folien auf die richtige Größe zugeschnitten und mit in die Stabilisierungslösung gelegt. Anschließend wurde eine Folie auf Blotting Paper zurechtgelegt, das Gel mittig

auf der unteren Folie platziert und die zweite Folie darüber gelegt. Mit einem Glasstab wurden nun die Luftblasen zwischen den Folien entfernt. Das Blotting Paper mit dem zwischen zwei Folien liegenden Gel wurde in den Geltrockner gelegt und mit einem weiteren Blotting Paper bedeckt. Der Geltrockner war an eine Vakuumpumpe und eine Kühlfalle gekoppelt, auf diese Weise wurde das Gel getrocknet und zwischen den Folien zur weiteren Verwahrung eingeschweißt. Der Geltrockner wurde auf 80°C eingestellt, der Vorgang dauerte zwei Stunden.

2.9.4 Auswertung

Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Software Delta2D. Der erste Schritt bestand darin, die sechs Gele mit dem Scanner (EPSON TWAID pro) einzuscannen und in das Programm Delta2D einzubinden. Alle weiteren Schritte wurden mit der Computer Software Delta2D ausgeführt. Auf der Suche nach unterschiedlicher Proteinexpression von *Streptococcus mitis* unter Einfluss von Cytarabin wurden zwei Gel-Gruppen gebildet. Der Gruppe 1 wurden die drei Gele welche aus den Proteinlösungen ohne Einfluss von Cytarabin resultierten zugeordnet. Gruppe 2 wurden die drei Gele welche aus den Proteinlösungen mit Einfluss von Cytarabin resultierten zugeordnet. In einem zweiten Schritt wurden immer zwei Gele miteinander verglichen. Jedes Gel aus Gruppe 1 mit den anderen beiden Gelen aus Gruppe 1. Dasselbe wurde mit den Gelen der Gruppe 2 durchgeführt. Aufgrund dessen, dass immer nur zwei Gele gleichzeitig gegossen werden konnten, mit denen eine parallele Gelelektrophorese durchgeführt wurde, lagen die Coomassie gefärbten Protein-Spots nicht exakt übereinander. Beim Vergleich zweier Gele färbt die Software die Protein-Spots des ausgewählten Gels blau, die Protein-Spots des Gels mit dem verglichen wird werden orange angefärbt. Korrespondierende Spots können mit einem Vektor verbunden werden und die Software führt ein “warping“ durch. Das Gel wird so verzogen, dass die korrespondierenden Spots übereinander liegen. Existieren Spots nur oder verstärkt auf dem ausgewählten Gel werden diese blau gefärbt, existieren Spots nur oder verstärkt auf dem verglichenen Gel werden diese

orange dargestellt. Ein visuelle Auswertung der Gele ist möglich. Gleichzeitig zur visuellen Darstellung der Unterschiede der Spots errechnet die Software auch Volumenwerte pro Spot, so dass sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen getroffen werden können. Ziel dieses zweiten Schrittes war ein möglichst exaktes übereinander legen der einzelnen Gele pro Gruppe, um aus diesen je ein Master-Gel erzeugen zu können.

Aus den drei Gelen aus Gruppe 1 wurde das Master-Gel 1, aus den drei Gelen aus Gruppe 2 das Master-Gel 2 erstellt. In einem dritten Schritt wurden nun die beiden Master-Gele verglichen, dies wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wie der Vergleich der Einzelgele. So konnten Protein-Spots identifiziert werden die nur oder verstärkt in Gruppe 1 (ohne Einfluss von Cytarabin) oder nur oder verstärkt in Gruppe 2 (mit Einfluss von Cytarabin) exprimiert wurden.

Die durch den Vergleich von zwei Master-Gelen interessierenden Protein-Spots wurden aus einem der eingeschweißten Gele mit einem Skalpell ausgeschnitten und einzeln in ein steriles, transportgeeignetes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur massenspektrometrischen Auswertung an die Firma Proteome Factory geschickt. Diese führte eine nanoLC-ESI-MS/MS durch (LC = Liquid Chromotography, ESI = Electrospray Ionization, MS = Mass Spectrometry).

2.10 Wasserstoffperoxid Messung

Der im Folgenden beschriebene Versuch diente der Ermittlung der Wasserstoffperoxid Produktion von *Streptococcus mitis* in Abhängigkeit von Cytarabin.

Die Messung der Wasserstoffperoxid Produktion basiert auf der durch Meerrettich-Peroxidase katalysierten Oxidation von Phenolrot bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Es resultiert eine Steigerung der Absorption bei 610 nm, welche eine lineare Beziehung zur Wasserstoffperoxid Konzentration aufweist [50].

Der Versuch wurde mit acht Stämmen je fünf mal durchgeführt. Es wurden maximal drei Stämme pro Versuchstag gemessen.

Vorversuche

Für die Messung der Wasserstoffperoxid Produktion wurde nach der von Pick und Keisari entwickelten und von Duane et *al.* modifizierten Methode vorgegangen und diese weiter entwickelt [12, 50]. Wie bei Pericone et *al.* beschrieben wurde die Kultivierung der Bakterien, die Produktion von Wasserstoff-Peroxid und die Herstellung der Standardreihe in BHI-Flüssigmedium durchgeführt [49]. Bei Etablierung der Standardreihe in BHI-Flüssigmedium waren die gemessenen Absorptionen starken Schwankungen unterworfen und die Entwicklung einer Standardreihe zur Berechnung der Wasserstoffperoxid Konzentrationen nicht möglich. Die Herstellung der Standardreihe und die Produktion des Wasserstoffperoxids durch die Bakterien sollte im gleichen Medium stattfinden, um keinen systematischen Fehler bei der Berechnung der Konzentrationen zu erhalten. Dazu wurden dem Peroxid-Puffer, der zur enzymatischen Reaktion verwendet wurde, 10 mM Glucose als Nährmittel beigefügt und als Peroxid-Puffer plus bezeichnet [62]. Mit diesem Puffer konnte eine Standardreihe (siehe unten) etabliert werden. Die weitere Durchführung des Versuchs wird in den nächsten Abschnitten beschrieben.

Vorbereitung

Da mit Cytarabin gearbeitet wurde, wurde der Versuch soweit möglich unter dem Abzug durchgeführt und Einmal-Materialien verwendet.

Es wurden pro Bakterienstamm zwei Übernacht-Kulturen hergestellt. Dazu wurden in zwei 15 ml Reaktionsgefäßen je 10 ml BHI-Flüssigmedium vorgelegt und von derselben Columbia-Blutplatte mit einer Einmal-Impfnadel einige Bakterienkolonien überführt. Ein Reaktionsgefäß wurde mit „A“ markiert und 10 μl Cytarabin-Stock (10 mg/l) dazu pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Standardreihe

Die produzierte Menge Wasserstoffperoxid wurde anhand einer Standardreihe, welche an jedem Versuchstag neu erstellt und gemessen wurde, errechnet. Für die Standardreihe wurden mit 30 % iger Wasserstoffperoxid-Lösung in Peroxid-Puffer plus bekannte Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Pipettierschema Standardreihe Wasserstoffperoxid-Versuch: Hergestellt aus Peroxid-Puffer plus (Puffer enthält 10 mM Glucose) und 1 mM Wasserstoffperoxid Lösung. Abkürzungen: H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, Konz. = Konentration, μM = Mikromolar, mM = Millimolar, μl = Mikroliter

Konz. (μM)	Peroxid-Puffer plus (μl)	1 mM H_2O_2 Lösung (μl)
0	1000	0
50	950	50
100	900	100
150	850	150
200	800	200
250	750	250
300	700	300
350	650	350
400	600	400
450	550	450
500	500	500

Durchführung

Die folgenden Vorgänge wurden parallel mit beiden Ansätzen (mit/ohne Cytarabin) auf dieselbe Weise durchgeführt. In ein 50 ml Reaktionsgefäß wurde 50 ml BHI-Flüssigmedium vorgelegt. Die Übernacht-Kultur wurde kurz gevortext, 1 ml davon in das

Reaktionsgefäß überführt und dieses bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterien wurden bis zur mid-log Phase bei einer OD_{620} von 0,3-0,4 kultiviert. Zur Messung im Photometer wurde eine 1:2 Verdünnung der Kultur hergestellt und gegen BHI-Flüssigmedium als Referenz gemessen. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde 10 Min mit 4.000 U/Min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 ml eisgekühltem HBSS resuspendiert und erneut 10 Min mit 4.000 U/Min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit dem doppelten Volumen (100 ml) Peroxid-Puffer plus resuspendiert und anschließend auf zwei Reaktionsgefäße mit je 50 ml Volumen aufgeteilt. Ein Reaktionsgefäß diente der Messung des vom Bakterienstamm produzierten Wasserstoffperoxid (im weiteren Probe genannt), das zweite Reaktionsgefäß diente als erste Kontrolle. Hier wurde bereits jetzt Catalase zugegeben um das gebildete Wasserstoffperoxid sofort wieder abzubauen. Beide Reaktionsgefäße (Probe und erste Kontrolle) wurden nun für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Hier erfolgte die Wasserstoffperoxid Produktion die anschließend gemessen werden sollte. Nach der Inkubation wurden beide Reaktionsgefäße 10 Min mit 4.000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit sterilen Einmal-Spritzen (20 ml) durch 0,22 μm Filter in 15 ml Reaktionsgefäße steril filtriert, dabei wurden 10 ml der Probe als zweite Kontrolle in ein extra Reaktionsgefäß filtriert. Auch in die zweite Kontrolle wurde Catalase zugegeben um das produzierte Wasserstoffperoxid zu eliminieren. Pro Bakterienstamm erhielt man so sechs Reaktionsgefäße (siehe Tabelle 2.8)

Tabelle 2.8: Schema Wasserstoffperoxid-Versuch: Aufteilung der Reaktionsgefäße. Abkürzungen: AraC = Cytarabin

mit AraC	Probe	1. Kontrolle	2. Kontrolle
ohne AraC	Probe	1. Kontrolle	2. Kontrolle

Zur Überprüfung der Sterilfiltration wurde pro Bakterienstamm eine Columbia-Blutplatte in sechs Bereiche aufgeteilt und mit einer einmal Impföse je ein Tropfen auf

der Columbia-Blutplatte verstrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C und 5 %CO_2 bebrütet und anschließend auf Wachstum von Bakterienkolonien überprüft. Desweiteren wurde aus dem Proben-Gefäß (keine Sterilfiltration) ein Ausstrich auf eine Columbia-Blutplatte durchgeführt, um Kontaminationen der Probe auszuschließen. Auch diese Blutplatten wurden über Nacht bei 37°C und 5 %CO_2 bebrütet. Das Wachstum ausschließlich vergrünender Kolonien gleicher Morphologie wurde als Reinheitskontrolle akzeptiert und der Versuch konnte gewertet werden.

Der enzymatische Nachweis von Wasserstoffperoxid wurde mit den vorbereiteten Konzentrationen der Standardreihe und pro Bakterienstamm mit den sechs hergestellten Filtrationen durchgeführt. Für die Nachweisreaktion wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Die berechneten Mengen Merrettich-Peroxidase und Phenolrot wurden direkt vor Gebrauch der benötigten Menge Peroxid-Puffer plus beigefügt, sehr vorsichtig mit diesem gemischt und je 1,05 ml davon in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Danach wurden je 250 μl der zu messenden Lösungen dazu pipettiert. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden verschlossen und die Lösungen auf dem Vortexer kurz gemischt. Die enzymatische Reaktion fand bei 37°C im Brutschrank statt und wurde nach 30 Min. mit je 5 μl NaOH abgestoppt. Das NaOH wurde nacheinander in alle Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und diese kurz gevortext.

Messung

Die Messung erfolgte in einer 96-Well Microplatte im Milenia Kinetic Analyzer, einem ELISA-Reader. Es wurden je 200 μl der zu messenden Lösung in die 96-Well Microplatte pipettiert. Jede Lösung wurde doppelt pipettiert und somit im doppelten Ansatz gemessen. Die so beladene 96-Well Microplatte wurde in den ELISA-Reader eingesetzt und bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenz diente die Konzentration 0 mM aus der Standardreihe. Im Programm wurde eine Maske, welche den Inhalt der 96 Wells der Microplatte beschreibt, definiert. Dabei bezeichnete „Blank“ den Referenzwert und „Empty“ leere Wells (hier wurde keine Messung durchgeführt, bzw.

kein Messwert an das Programm zurückgegeben). Die Wells „Unknown“ enthielten die Proben. Die Felder wurden mit Stammnummer, 1. Kontrolle, 2. Kontrolle und „A“ für Cytarabin bezeichnet. Die Wells der Standardreihe wurden als „Standard “ definiert und die entsprechenden Konzentrationen eingetragen.

Statistik

Von 18 Bakterienstämmen der Kinderklinik wurden 8 Stämme (2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 17) auf die Wasserstoffperoxid Produktion unter Einfluss von Cytarabin untersucht. Sowohl die Standardreihe, als auch die zu messenden Lösungen wurden doppelt in die 96-Well-Platte pipettiert und somit doppelt gemessen.

Der Versuch wurde nur gewertet wenn die Standardreihe auswertbar war. Zur Ermittlung der Standardreihe wurde von jeder Konzentration aus der doppelt gemessenen OD_{600} der Mittelwert berechnet. Diese Mittelwerte wurden in ein Diagramm eingetragen und eine logarithmische Regressionslinie eingefügt. Die Formel der Regressionslinie $f(x) = a * ln(x) + b$ wurde vom Grafikprogramm Graph 4.3 ermittelt. Anhand dieser Formel wurden die Wasserstoffperoxid Konzentrationen berechnet und aus den Doppelbestimmungen Mittelwerte gebildet. Pro Stamm wurden 5 Messungen mit und 5 Messungen ohne Einfluss von Cytarabin durchgeführt. Insgesamt wurden je 40 Wasserstoffperoxid-Konzentrationen ermittelt.

Es wurden Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum errechnet.

Die Nullhypothese H_0 besagt, dass es durch Einfluss von Cytarabin zu keinem signifikanten Einfluss auf die Wasserstoffperoxid Produktion von *Streptococcus mitis* kommt (Mittelwert ohne Cytarabin = Mittelwert mit Cytarabin). Die zweiseitige Fragestellung wurde gewählt um sowohl eine Hemmung als auch eine Stimulation der Wasserstoffperoxid-Produktion nachweisen zu können. Es wurde ein t-test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0{,}05$ festgelegt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Reihenverdünnungstest

Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Daunorubicin können das Wachstum von Bakterien hemmen [1, 7, 45]. Ob Cytarabin ähnliche Eigenschaften besitzt und möglicherweise andere orale Streptokokken stärker im Wachstum hemmt als *Streptococcus mitis* wurde im Reihenverdünnungstest untersucht. Hierzu wurden 16 *Streptococcus mitis*-Stämme der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin mit 17 *Streptococcus oralis*-Stämmen aus verschiedenen Abteilungen der Universitätsklinik Ulm verglichen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Ergebnisse des Reihenverdünnungstests: Angabe der Cytarabin MHK in mg/l; Abkürzungen: MHK = minimale Hemmkonzentration, mg/l = milligramm/liter

Species	Anzahl der Stämme	Cytarabin MHK in mg/l
Streptococcus mitis	16	≥ 128
Streptococcus oralis	17	≥ 128

Es zeigte sich kein Wachstumsvorteil unter Einfluss von Cytarabin von *Streptococcus mitis* gegenüber *Streptococcus oralis*.

3.2 Nachweis des Autolyse Gens *lytA*

Das Autolyse Gen *lytA* ein bekannter Pathogenitätsfaktor von *Streptococcus pneumoniae* wurde auch bei einigen *Streptococcus mitis*-Stämmen nachgewiesen [31, 65]. Zur weiteren molekularen Charakterisierung der *Streptococcus mitis*-Stämme wurde daher auch bestimmt, ob sie ein *lytA* Gen tragen. Es wurden alle 18 Blutkultur-Isolate der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (16 *Streptococcus mitis*-Stämme und 2 *Streptococcus oralis*-Stämme siehe Tabelle 2.1) auf das *lytA* Gen untersucht.

Nach Isolierung der DNA aus den Bakterienstämmen wurde deren Konzentrationen photometrisch bestimmmt (siehe Tabelle 3.2). Im LightCycler wurden die 18 Bakteri-

Tabelle 3.2: DNA-Konzentrationen; Abkürzungen: mg/l = milligramm/liter, Int. Nr = Interne Nummer des Keims, Konz. = Konzentration

Int. Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Konz. (mg/l)	690	1190	620	40	50	640	20	1010	970
Int. Nr	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Konz. (mg/l)	680	620	170	20	3150	1960	1200	890	1490

enstämme, eine Negativ- und eine Positivkontrolle untersucht. Sowohl die Amplifikation, die Melting curve und die Quantifizierung zeigten ausschließlich in der Positivkontrolle einen Nachweis des Autolyse Gens *lytA*.

Das Autolyse Gen *lytA* konnte weder bei *Streptococcus mitis* noch bei *Streptococcus oralis* nachgewiesen werden.

3.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Ziel der Pulsfeldgelelektrophorese war es, festzustellen ob die Viridans-Streptokokken, welche aus Blutkulturen von mit Cytarabin behandelten Kindern aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (16 *Streptococcus mitis*, 2 *Streptococcus oralis* siehe Tabelle 2.1) isoliert wurden, ein Klon sind. Das digital abphotografierte Gel der PFGE vom 07.04.2005 ist in der Abbildung 3.1 zu sehen.

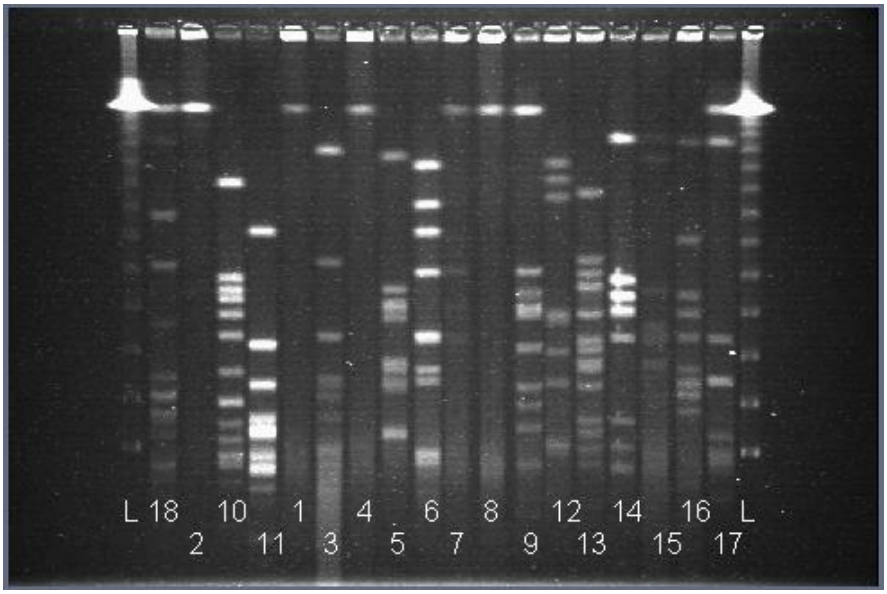

Abbildung 3.1: Pulsfeldgelelektrophorese von 18 Bakterienstämmen der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin; Restriktionsenzym SmaI; Abkürzungen: L = Lambda Ladder (Größenstandard), 18 und 10 = *Streptococcus oralis*, 1 - 9 und 11 - 17 = *Streptococcus mitis*

Für 4 der 18 untersuchten Stämme konnte durch die eingesetzte Methode auch nach wiederholten Versuchen kein adäquater Verdau der chromosomalen DNA erreicht werden. Bei den anderen Stämmen ließ sich keine Verwandschaft zwischen den Isolaten nachweisen.

3.4 Proteom

Ziel der Auftrennung des Proteoms mittels 2D-Gelelektrophorese war die Untersuchung, ob es zu einer veränderter Proteinexpression unter Einfluss von Cytarabin kommt.

In Tabelle 3.3 sind die photometrisch bestimmten Proteinkonzentrationen (siehe Methode 2.9.1) aufgezeigt. Anhand dieser Konzentrationen wurde die eingesetzte Menge der einzelnen Proteinlösungen für die Herstellung der 2D-Gele berechnet. Für die Färbung der 2D-Gele mit Coomassie Brilliant Blue G250 wurde eine Proteinmenge von 120 μg benötigt (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 3.3: Proteinkonzentrationen aus der Gesamtproteingewinnung. Die Proteinlösungen wurden nach der Reihenfolge der Herstellung Nummeriert, A steht für den Einfluss von Cytarabin. Abkürzungen: μg/μl = mikrogramm/mikroliter

Bezeichnung	Konzentration (μg/μl)
1	10,76
2	11,64
3	21,40
1A	17,18
2A	6,22
3A	6,02

Nach Fertigstellung der Gele erfolgte zuerst eine visuelle Auswertung. In Abbildung 3.2 sind zwei 2D-Gele gegenübergestellt. Das linke Gel zeigt das nach pH-Wert und Molekülgröße aufgetrennte Proteom ohne Einfluss von Cytarabin. Das rechte Gel zeigt das Proteom welches unter Einfluss von Cytarabin gewonnen wurde. Die Auswertung aller sechs Gele erfolgte mittels der Software Delta2D von Decodon. Das genaue Vorgehen wurde in der Methode 2.9.4 beschrieben. Es erfolgte zuerst eine visuelle Auswertung, bevor eine quantitative Berechnung der Intensitätsunterschiede stattfand.

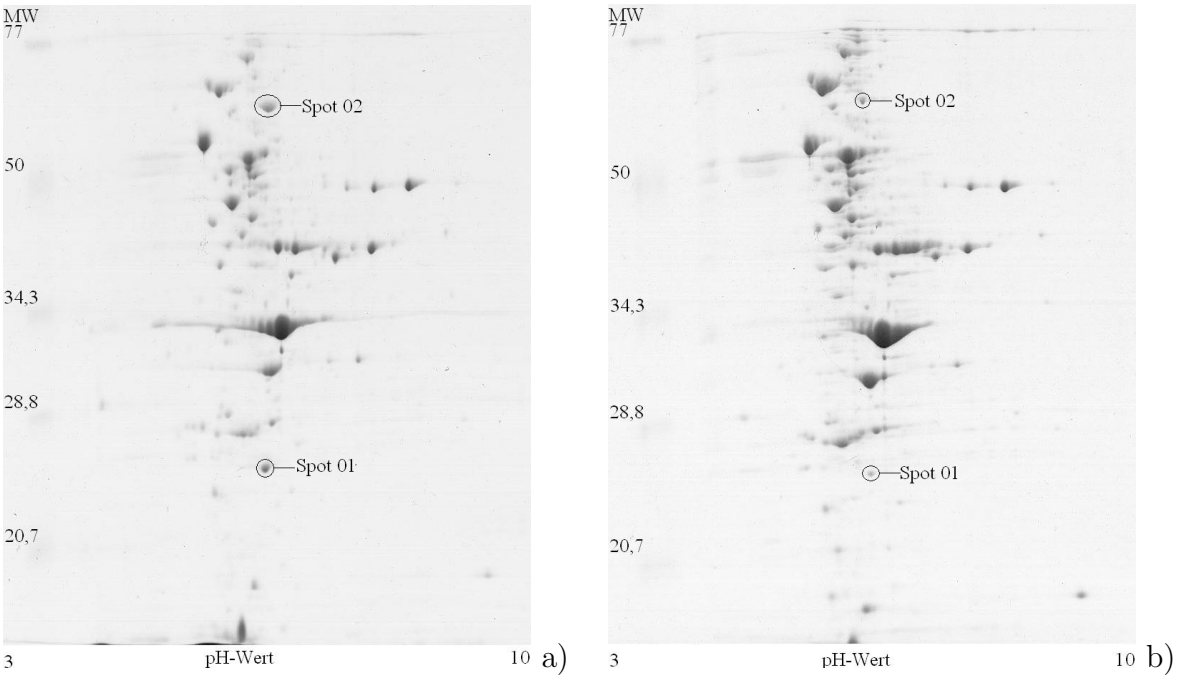

Abbildung 3.2: 2D-Gelelektrophorese gefärbt mit Coomassie Brillant Blue a) Proteinlösung 1 (ohne Cytarabin), b) Proteinlösung 1A (mit Cytarabin); Markiert sind die im weiteren Verlauf interessierenden Spots 01 und 02; Abkürzungen: MW = Molekulargewicht in kiloDalton.

Mit Hilfe der Software wurden sechs Proteinspots (01 bis 06) ausgewählt, die einen deutlichen Unterschied in der Intensität der Färbung aufwiesen.

Die Spots 01 und 02 waren deutlich auf den Originalgelen zu sehen und der Unterschied der Farbintensität und damit der unterschiedlichen Proteinexpression war auf allen Gelen nachvollziebar. Die Spots 03, 04 und 05 waren auf dem Master-Gel der Gruppe 1 (ohne Einfluss von Cytarabin) stärker angefärbt, was auf eine verstärkte Proteinexpression ohne Cytarabin bzw. auf eine Inhibierung durch Cytarabin hindeutet. Der Spot 06 war auf dem Master-Gel der Gruppe 2 (mit Einfluss von Cytarabin) stärker angefärbt, was ein Hinweis auf verstärkte Proteinexpression unter Einfluss von Cytarabin sein kann. Die Spots 03 bis 06 konnten auf den Originalgelen kaum identifiziert werden. Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die mittels Computer Software ermittelten Proteinspots 01 und 02 wie sie sich in den übereinander gelegten Master-Gelen darstellen. Das blau gefärbte Gel entspricht dem Master-Gel 1 (ohne Einfluss von Cytarabin) und das orange gefärbte Gel dem Master-Gel 2 (mit Einfluss von Cytarabin).

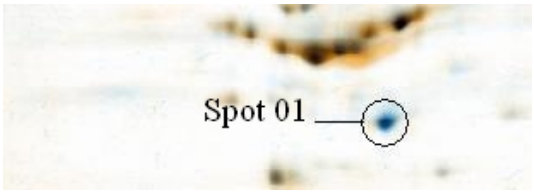

Abbildung 3.3: Spot 01 Master-Gel: blau = Master-Gel ohne Einfluss von Cytarabin, orange = Master-Gel mit Einfluss von Cytarabin.

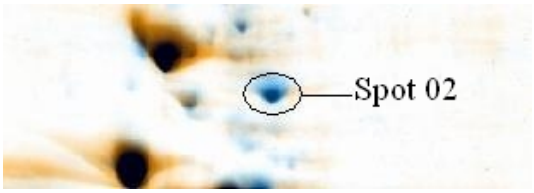

Abbildung 3.4: Spot 02 Master-Gel: blau = Master-Gel ohne Einfluss von Cytarabin, orange = Master-Gel mit Einfluss von Cytarabin.

Zur quantitative Auswertung der Proteinspots berechnet die Software für jeden Proteinspot anhand der Intensität der Färbung das Volumen. Tabelle 3.4 zeigt die von

der Software ermittelten Spots 01 bis 06 in ihrer Intensität auf jedem einzelnen Gel. Tabelle 3.5 zeigt die Zusammenfassung der einzelnen Volumina der sechs Proteinspots pro Gruppe.

Tabelle 3.4: Tabellarische Auswertung der einzelnen 2D-Polyacrylamidgele: Die Nummerierung der Gele entspricht der Nummerierung der Proteinlösungen in der Reihenfolge ihrer Herstellung. Abkürzungen: A = Cytarabin-Einfluss, Vol = Volume

	2D-Gele ohne Cytarabin-Einfluss			2D-Gele mit Cytarabin-Einfluss		
	% Vol 1	% Vol 2	% Vol 3	% Vol 1A	% Vol 2A	% Vol 3A
Spot 01	1,481	1,129	0,215	0,259	0,28	0,218
Spot 02	1,868	2,059	0,57	0,44	0,153	0,139
Spot 03	0,13	0,118	-	-	-	-
Spot 04	0,076	0,05	0,064	-	-	-
Spot 05	0,208	0,189	0,062	0,06	0,067	0,069
Spot 06	0,043	0,082	0,346	0,182	1,113	0,372

Die Proteinspots 03 und 04 wurden ausschließlich auf den 2D-Gelen ohne Cytarabin-Einfluss exprimiert. Die Konzentration dieser beiden Spots ist aber so gering, dass diese auf den Originalgelen kaum zu sehen waren und daher für eine weitere Untersuchung nicht geeignet waren. Der Proteinspot 05 wurde ohne Cytarabin-Einfluss um das 2fache stärker exprimiert als unter Einfluss von Cytarabin. Auch die Konzentration dieses Spots war so gering, dass er durch die Computer Software erkannt wurde, eine genaue Identifizierung auf einem der Originalgele jedoch nicht möglich war. Auch hier erfolgte keine weitere Untersuchung. Proteinspot 06 wurde unter Einfluss von Cytarabin um mehr als das 3fache stärker exprimiert, jedoch war auch hier eine genauere Untersuchung aufgrund der geringen Färbung im Originalgel nicht möglich. Proteinspot 01 und 02 zeigen ohne Cytarabin-Einfluss eine mehr als 3fach bzw. 6fach stärkere Expression, als unter Einfluss von Cytarabin. Beide Spots sind auf den Originalgelen gut zu identifizieren, aus diesem Grund wurden die Proteinspots 01 und 02 aus einem Originalgel

Tabelle 3.5: Tabellarische Auswertung der Mastergele der 2D-Polyacrylamidgele: Durchschnitt der berechneten Volumina. Abkürzungen: av % Vol = average % Volume, G1 = Gruppe1 (Mastergel ohne Cytarabin), G2 = Gruppe2 (Mastergel mit Cytarabin)

av % Vol G1		av % Vol G2	ratio G2/G1	ratio G1/G2
Spot 01	0,941	0,252	0,267	3,734
Spot 02	1,499	0,244	0,163	6,143
Spot 03	-	-	-	-
Spot 04	-	-	-	-
Spot 05	0,153	0,065	0,425	2,352
Spot 06	0,137	0,556	3,541	0,246

ausgeschnitten und zur Identifizierung des Proteins an die Firma Proteome Factory geschickt.

Proteinspot 01 wurde als „manganese co-factored superoxid dismutase“ und Proteinspot 02 als „pyruvate oxidase“ identifiziert.

Die Auswertung der 2D-Gelelektrophorese zeigt eine veränderte Proteinexpression von *Streptococcus mitis* unter Einfluss von Cytarabin.

3.5 Wasserstoffperoxid Messung

Ziel des Wasserstoffperoxid-Assays war es, den Einfluss von Cytarabin auf die Produktion von Wasserstoffperoxid durch *Streptococcus mitis* zu untersuchen.

Je Stichprobe (ohne / mit Cytarabin) wurden 40 Wasserstoffperoxid Konzentrationen ermittelt (siehe Methode 2.10). Die Einzelwerte pro Bakterienstamm sind in Grafik 3.5 dargestellt. Es zeigen sich einige Ausreißer (z.B. Stamm 17 ohne AraC = 519, 833 μM, Stamm 6 mit Arac = 438,817 μM), sowie insgesamt eine breite Streuung der Werte innerhalb eines Bakterienstammes und zwischen den Bakterienstämmen (Min 22,654 μM, Max 519,833 μM).

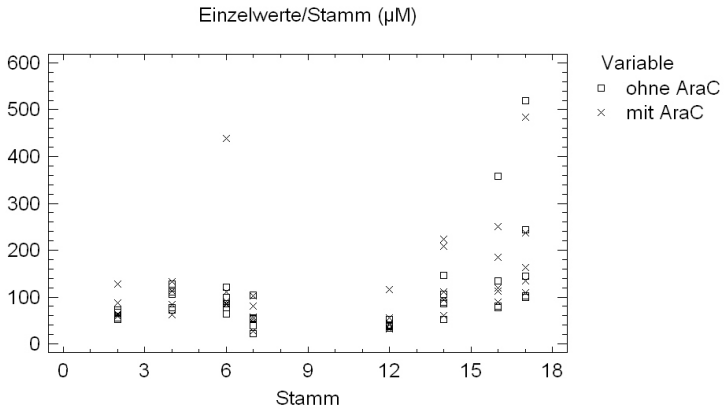

Abbildung 3.5: Wasserstoffperoxid Konzentrationen pro Bakterienstamm (mit / ohne AraC): x-Achse: Interne Nummer des Bakterienstamms, y-Achse: Wasserstoffperoxid Konzentration in μM; Abkürzungen: AraC = Cytarabin, μM = Mikromolar.

Die Auswertung der Überprüfung der Sterilfiltration ergab von insgesamt 240 durchgeführten Kontrollen 11 (4,5 %) verunreinigte. Dabei waren in 2 (0,83 %) Fällen Proben betroffen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um Ausreißer (Stamm 14 mit AraC = 223,096 μM und Stamm 17 mit AraC = 109,066 μM). Bei den übrigen 9 (3,75 %) verunreinigten Überprüfungen waren die Kontrollen, welche Katalase enthielten, betroffen. Die geringen Verunreinigungen der Lösungen mit Bakterien nach Sterilfiltration hatten

keinen nachweisbaren Einfluss auf die enzymatische Reaktion.

Mit jeder Versuchsreihe wurde eine Standardreihe mitgeführt. Der Versuch wurde nur gewertet, wenn die Standardreihe auswertbar war. Der Vergleich der Standardreihen nach Abgleich mit dem Null-Wert zeigt leicht unterschiedliche Verläufe, ein klarer Trend ist jedoch erkennbar (siehe Abbildung 3.6).

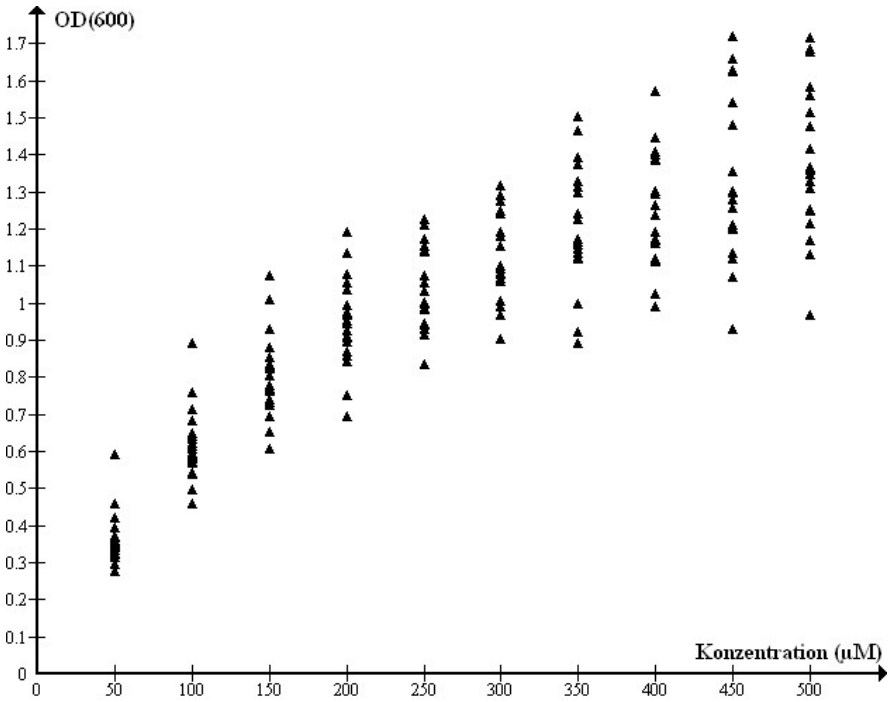

Abbildung 3.6: Standardreihen Wasserstoffperoxid-Assay: Abkürzungen: OD = optische Dichte (bei 600 nanometer) , μM = mikromolar

Der Mittelwert der gemessenen Wasserstoffperoxid Konzentrationen ohne Einfluss von Cytarabin (±Standardabweichung) betrug 102,408 ±90,336 μM, mit Einfluss von Cytarabin lag der Mittelwert (±Standardabweichung) bei 121,947 ±95,809 μM, damit liegt die Standardabweichung in beiden Fällen sehr hoch. Die in Tabelle 3.6 aufgezeigten statistischen Werte (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Median) zeigen nur einen geringen Unterschied bei Vergleich der beiden Stichproben. Dies ist in Abbildung 3.7, welche die Verteilung der Daten beider Stichproben durch Box-Whisker-Plot darstellt, veranschaulicht. Auffällig ist der stark vom Mittelwert (s.o.)

abweichende Median mit 78,994 μM ohne Einfluss von Cytarabin und 92,994 μM mit Einfluss von Cytarabin. Dies weist zum einen auf eine schiefe Verteilung hin (siehe Abbildung 3.8), kann aber auch durch die Ausreißer (siehe Abbildung 3.7) bedingt sein, die den Mittelwert stärker beeinflussen als den Median.

Tabelle 3.6: Wasserstoffperoxid statistische Maßzahlen Vergleich der Stichprobe 0 = ohne Einfluss von Cytarabin mit der Stichprobe 1 = mit Einfluss von AraC, die Wasserstoffperoxid Konzentrationen sind in μM angegeben. Abkürzungen: AraC = Cytarabin, μM = Mikromolar, s = Standardabweichung, Max = Maximum, M = Median, Min = Minimum, MW = Mittelwert

	Konz 0	Konz 1
Anzahl	40	40
MW	102,408	121,947
s	90,336	95,809
M	78,994	92,994
Min	22,654	26,292
Max	519,833	483,202

Die Durchführung des t-Tests ist nur bei normalverteilten Daten durchführbar. Wie Abbildung 3.8 zeigt, liegt in beiden Stichproben eine schiefe Verteilung vor. Nach logarithmieren der Werte zeigt sich eine Normalverteilung (siehe Abbildung 3.9), diese wird auch als t-Verteilung bezeichnet. Die Durchführung eines t-Tests ist somit erlaubt.

Der t-test errechnet für den Vergleich der beiden Stichproben (1 = ohne Cytarabin, 2 = mit Cytarabin) einen p-Wert von 0,195. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0{,}05$ festgelegt, damit besteht unter den gewählten Versuchsbedingungen kein signifikanter Einfluss von Cytarabin auf die Wasserstoffperoxid-Produktion von *Streptococcus mitis*.

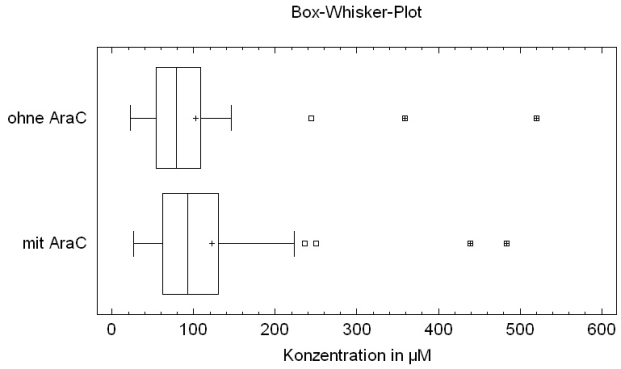

Abbildung 3.7: Wasserstoffperoxid-Assay Box-Whisker-Plots (mit / ohne AraC) mit Darstellung der Ausreißer. Abkürzungen: * = Mittelwert, AraC = Cytarabin, μM = Mikromolar.

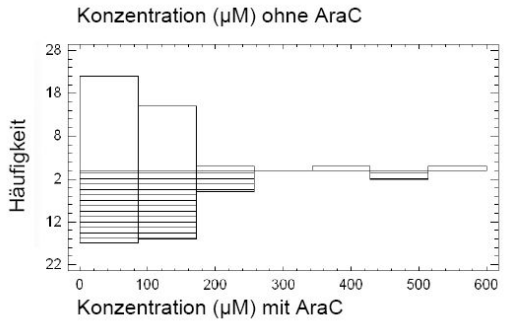

Abbildung 3.8: Wasserstoffperoxid-Assay Histogramm: nach oben aufgetragen die Häufigkeiten der Wasserstoffperoxid Konzentrationen ohne Einfluss von AraC, nach unten aufgetragen die Häufigkeiten der Wasserstoffperoxid Konzentrationen mit Einfluss von AraC; Abkürzungen: AraC = Cytarabin, μM = Mikromolar

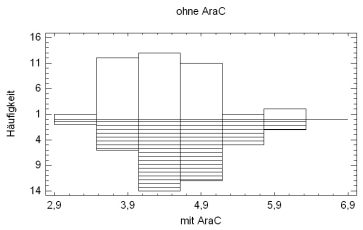

Abbildung 3.9: Wassserstoffperoxid-Assay Histogramm t-Verteilung: nach oben aufgetragen die Häufigkeiten der logarithmierten Werte ohne Einfluss von AraC, nach unten aufgetragen die Häufigkeiten der logarithmierten Werte mit Einfluss von AraC; Abkürzungen: AraC = Cytarabin, μM = Mikromolar

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Reihenverdünnungstest

Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Daunorubicin können das Wachstum von Bakterien hemmen [1, 7, 45]. Da bei Leukämie-Patienten mit hochdosierter Cytarabin Therapie häufig Infektionen mit Viridans-Streptokokken und darunter hauptsächlich von *Streptococcus mitis* auftreten, wurde mit den Reihenverdünnungstests untersucht, ob Cytarabin das Wachstum anderer Viridans-Streptokokken, wie *Streptococcus oralis*, stärker hemmt als das Wachstum von *Streptococcus mitis* und diese dadurch einen Wachstumsvorteil haben.

Der Reihenverdünnungstest wurde mit Cytarabin Konzentrationen von 1 mg/l bis 256 mg/l in geometrischer Verdünnung (siehe Methode 2.6) durchgeführt. Dies entspricht einem Bereich von 4,11 μM/l bis 1052,1 μM/l. In der konventionellen Therapie werden 100 bis 200 mg Cytarabin/m^2 Körperoberfläche intravenös infundiert, dabei werden Plasmakonzentratinen von 0,04 μM/l bis 0,6 μM/l erreicht. Bei der Hochdosistherapie mit Cytarabin werden 1 bis 3 g Cytarabin/m^2 Körperoberfläche intravenös infundiert wobei Plasmakonzentrationen in einem Bereich von 10 μM/l bis 140 μM/l erreicht werden [3, 5, 33, 42]. Da das Auftreten von Infektionen mit *Streptococcus mitis* im Zusammenhang mit der Hochdosistherapie gesehen wird, wurden für diesen Test

verstärkt hohe Konzentrationen eingesetzt.

Der Versuch unterschiedliche minimale Hemmkonzentrationen, welche definiert ist als die niedrigste Konzentration der Substanz die das sichtbare Wachstum hemmt, von *Streptococcus mitis* zu anderen Viridans-Streptokokken für Cytarabin zu ermitteln war nicht möglich, da beide Versuchsgruppen bis weit über die *in vivo* erreichten Konzentrationen hinaus anwuchsen [2]. Auf eine Erhöhung der Konzentrationen zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration für alle Stämme wurde daher verzichtet. Die *in vivo* erreichten Konzentrationen von Cytarabin hemmen weder das Wachstum von *Streptococcus mitis*, noch das Wachstum anderer Viridans-Streptokokken. Ein Selektionsvorteil durch den Einfluss von Cytarabin auf ein verändertes Wachstumsverhalten von *Streptococcus mitis* gegenüber anderen Viridans-Streptokokken konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Nachweis des Autolyse Gens *LytA*

Das mit der Methode 2.7 gesuchte Gen *lytA* ist ein bekannter Pathogenitätsfaktor von *Streptococcus pneumoniae* und wird zur Identifizierung und Charakterisierung von *Streptococcus pneumoniae* Stämmen verwendet [60, 65]. Auch in *Streptococcus mitis* konnte das Gen *lytA* nachgewiesen werden [65]. Dabei handelte es sich meist um *Streptococcus mitis*-Isolate aus erkrankten Patienten, was die Theorie, bei Autolysin handelt es sich um einen Pathogenitätsfaktor, unterstützt [65].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cytarabin auf Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus mitis* untersucht. Bei LytA handelt es sich um einen Faktor, der die Pathogenität von *Streptococcus mitis* gegenüber anderen Kommensalen der Mundflora erhöhen könnte. Da bisher nicht untersucht wurde, ob pathogene *Streptococcus mitis* Stämme von Leukämiepatienten dieses Gen vermehrt tragen, wurden alle 18 Bakterienstämme mittels LightCycler PCR auf das Vorhandensein von *lytA* untersucht. In keinem der von uns untersuchten Bakterienstämme konnte das Autolyse Gen *lytA* nachgewiesen werden.

Entweder keiner der von uns untersuchten Stämme aus Blutkulturen trägt das Autolysin Gen [65], oder die Sequenz des *lytA* in *Streptococcus mitis* unterscheidet sich in einigen Basenpaaren [38]. Befinden sich diese Unterschiede in der Sonden-bindenden Region kann das Produkt nicht detektiert werden [60]. Da sich keine Hinweise auf die Anwesenheit von LytA in den von uns untersuchten Stämmen finden ließ, wurde auf eine weitergehende Suche nach bisher nicht detektierten *lytA* Varianten verzichtet.

4.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Die PFGE ist eine Methode zur Typisierung von Bakterien. Sie stellt neben der MLST (multilocus sequence typing) den Gold-Standard zur Typisierung von Streptokokken dar [21]. Die MLST steht im Bereich der Viridans-Streptokokken nur für die Typisierung von *Streptococcus pneumoniae* zur Verfügung. Zur epidemiologischen Untersuchung weiterer Viridans-Streptokokken, wie der in dieser Arbeit untersuchten *Streptococcus mitis*- und *Streptococcus oralis*-Stämme, wird daher die PFGE verwendet [66]. Die Epidemiologie ist ein wichtiges Instrument um die Ausbreitung pathogener Keime zu verfolgen und Infektionsketten zu erkennen [36]. Sie gibt Hinweise zur Evolution des untersuchten Pathogens und kann Klone mit speziellen Eigenschaften, wie Beispielsweise Antibiotika-Resistenzen, aufspüren [21]. Mit Hilfe der PFGE können z.B. Organismen, welche mit Krankheitsausbrüchen assoziiert sind klar differenziert werden um die Herkunft der Bakterien zu identifizieren und die Dynamik bakterieller Übertragung beschreiben [61].

Bei der PFGE wird das gesamte Genom mittels selten schneidender Restriktionsendonukleasen verdaut, daraus resultieren wenige große DNA-Fragmente [61]. Diese Fragmente chromosomaler DNA werden in einem Agarose Gel bei alternierender Stromrichtung aufgetrennt. Die nach Färbung des Agarose Gels mit Ethidiumbromid [39] sichtbaren Fragment-Bandenmuster charakterisieren den Bakterienstamm [21, 36, 63]. Die Bandenmuster der aufgetrennten Bakterien-Isolate werden miteinander verglichen [61]. Die Verwandschaft zwischen den Isolaten erschließt sich aus der Gleichheit der

Bandenmuster [63].

Ein großer Vorteil der PFGE ist die schnellere Durchführung im Vergleich zur MLST [21, 63]. Der Nachteil liegt in dem hohen technischen Aufwand da zum einen eine spezielle Apparatur für die PFGE benötigt wird [21, 63] und zum anderen die Protokolle im Labor etabliert werden müssen [63].

Die Auswertung der PFGE erfolgt nach den Richtlinien von Tenover et *al.* aus dem Jahr 1995. Danach sollten um eine verlässliche Auswertung zu ermöglichen pro Isolat mindestens 10 Banden zu sehen sein. Es werden vier Kategorien unterschieden, wonach verschieden Isolate mit identischem Bandenmuster als verwandt, Isolate mit zwei bis drei unterschiedlichen Banden als nah verwandt, Isolate mit vier bis sechs unterschiedlichen Banden als eventuell verwandt und Isolate mit mehr als sieben unterschiedlichen Banden bzw. weniger als 50 % Übereinstimmungen als nicht verwandt angesehen werden [63].

Ein weiteres Problem der PFGE stellt die Reproduzierbarkeit der Daten dar. Da es sich beim Vergleich der Bandenmuster um kein quantitatives Merkmal handelt, können Untersuchungen, welche in verschiedenen Labors durchgeführt wurden, schlecht verglichen werden. Der Vergleich verschiedener Isolate in einem Labor ist möglich. [21, 30, 36].

Ziel der PFGE war die Untersuchung der Verwandschaftsbeziehungen der 18 Isolate der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (siehe Tabelle 2.1). Hintergrund war die Frage nach dem Infektionsweg.

Die ulzerative Mukositis wird als Risikofaktor für eine Infektion mit Viridans-Streptokokken diskutiert. Ruescher et *al.* verglich Patienten mit Viridans-Streptokokken Bakteriämie nach autologer Knochenmark-Transplantation zur Therapie einer hämatologischen Grunderkrankung mit Patienten ohne Bakteriämie nach gleicher Therapie. Es zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko bei Vorliegen einer ulzerativen Mukositis an einer Viridans-Streptokokken Bakteriämie zu erkranken. 63 % (15 von 24) der Patienten mit Viridans-Streptokokken Bakteriämie hatten zusätzlich eine ulzerative Mukositis, in der Kontrollgruppe ohne Bakteriämie waren nur 36 % (16 von 45) an einer ulzerativen

Mukositis erkrankt [58]. Den Zusammenhang zwischen der diskutierten Eintrittspforte Mundhöhle und der Viridans-Streptokokken Bakteriämie stellten Kennedy et *al.* her. Bei einem 15 Jahre alten Jungen nach Knochenmark-Transplantation mit polymikrobieller Bakteriämie durch *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus oralis* wurden die Isolate aus der Blutkultur mit den aus der Mundhöhle des Jungen stammenden Isolaten mittels PFGE verglichen. Für beide Isolate konnten identische Stämme in der Mundhöhle nachgewiesen werden, was für die Mundhöhle als Eintrittspforte spricht [28]. Untersuchungen der Kolonisation der Mundhöhle mit Viridans-Streptokokken bei Neugeborenen im ersten Lebensjahr und von Erwachsenen zeigten eine hohe Diversität der *Streptococcus mitis*-Stämme. Hohwy et *al.* untersuchte zwei Kinder und deren Eltern. Die zu verschiedenen Zeitpunkten isolierten *Streptococcus mitis*-Stämme wurden miteinander verglichen. Bei den Kindern wurde jeder Stamm nur ein einziges mal nachgewiesen, wohingegen bei den Eltern ein Stamm über mehrere Wochen nachgewiesen werden konnte, bei einer Kontrolluntersuchung nach 5 Jahren jedoch keiner der vormals isolierten Stämme nachweisbar war. Dies spricht für eine transiente Besiedelung der Mundhöhle mit *Streptococcus mitis*, eine Persistenz eines dominanten Stammes über mehrere Wochen ist möglich [22]. Eine Untersuchung von Kirchherr et *al.* zeigte ähnliche Ergebnisse. Von 859 *Streptococcus mitis*-Isolaten konnten 568 Stämme nur einmal nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch auch bei den Neugeborenen vorübergehende dominierende Stämme, die entweder bei einer Abstrichrunde an verschiedenen Stellen der Mundhöhle (Wangenschleimhaut, Zunge) nachgewiesen wurden oder an aufeinander folgenden Abstrichrunden in wechselnden Nischen der Mundhöhle nachweisbar waren [32].

Handelt es sich bei den isolierten Keimen um einen Klon, wäre eine mögliche Erklärung die Transmission eines Keims von Patient zu Patient. Handelte es sich um unterschiedliche Keime, wäre aufgrund der oben genannten Ausführungen eine endogene Infektion wahrscheinlich.

Alle 14 auswertbare Isolate weisen ein unterschiedliches Bandenmuster auf, so dass eine Patient-zu-Patient Transmission unwahrscheinlich ist. Dieses Ergebnis weist auf

einen endogenen Infektionsweg hin.

Desweiteren zeigen die Isolate, die von einem Patienten stammen ebenfalls unterschiedliche Bandenmuster. Dabei handelt es sich um zwei Patienten, die an einer Doppel-Infektion mit *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* erkrankt waren (Blutkulturnummer 261714 und 274877 siehe Tabelle 2.1) und um zwei Patienten, die im Abstand von 4 bzw. 6 Monaten erneut an einer *Streptococcus mitis* Bakteriämie erkrankten (Blutkulturnummer 273033/276867 und 274810/280680 siehe Tabelle 2.1). Dies ist ebenfalls ein Hinweis auf einen endogenen Infektionsweg.

Wisplinghoff et *al.* untersuchte 57 Bakteriämien durch Viridans-Streptokokken in neutropenischen Patienten mit hämatologischer Grunderkrankung. Dabei wurden 37 *Streptococcus mitis*- und 19 *Streptococcus oralis*-Stämme identifiziert. Alle *Streptococcus mitis*-Stämme aus unterschiedlichen Patienten wiesen ein unterschiedliches Bandenmuster auf, ebenso die isolierten *Streptococcus oralis*-Stämme. Ein Patient erkrankte im Abstand von 19 Monaten an zwei Infektions-Episoden mit unterschiedlichen *Streptococcus mitis*-Stämmen und zwei Patienten machten zwei Infektions-Episoden zum ersten mit *Streptococcus mitis* und zum zweiten mit *Streptococcus oralis* durch. Auch Wisplinghoff et *al.* führt die Infektionen durch Viridans-Streptokokken auf endogene Quellen zurück. Eine Patient-zu-Patient Transmission fand auch in seiner Studie nicht statt. Jedoch zeigte die Studie von Wisplinghoff et *al.* den Fall einer Reinfektion. Ein Patient erkrankte im Abstand von je 4 Wochen an insgesamt 4 Bakteriämien durch jeweils den Gleichen *Streptococcus mitis*-Stamm. Dies spricht für die Persistenz eines dominierenden Stammes über mehrere Wochen[66].

Unsere Ergebnisse stimmen mit der Studie von Wisplinghoff et *al.* überein. Mit der Ausnahme, dass in unserer Studie keine Reinfektion gezeigt wurde. Dies kann auch in der geringen Fallzahl unserer Untersuchung begründet sein. Eine endogene Infektion mit *Streptococcus mitis* bei Patienten unter Hochdosis Cytarabin Therapie mit hämatologischer Grunderkrankung ist wahrscheinlich.

4.4 Proteom

Die Einschränkungen der Untersuchung des Proteoms liegen in der Reproduzierbarkeit der Methoden. Wir haben für diese Arbeit die 2D-Gelelektrophorese nach O'Farrell et *al.* [46] gewählt (siehe Methode 2.9.2). Die Auftrennung des Proteoms erfolgt hierbei in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt, durch isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten. Der von uns verwendete immobilisierte pH-Gradient hat gegenüber der isoelektrischen Fokussierung mittels Trägerampholyte welche den pH-Gradienten im elektrischen Feld ausbilden den Vorteil, dass der pH-Gradient über die Zeit stabil bleibt und durch die Herstellung aus definierten Chemikalien auch unabhängig von der Produktionscharge ist, was die Reproduzierbarkeit gewährleistet. Die Auftrennung der zweiten Dimension erfolgt nach dem Molekulargewicht der Proteine, hierfür wurde die vertikale kontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Shapiro et *al.* [59] verwendet. Bei dieser Methode werden die Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Porengröße ist abhängig von der Konzentration des Acrylamid. Je geringer die Acrylamid-Konzentration, desto größer die Poren und desto geringer der Siebeffekt. Die Porengröße lässt sich durch die Verwendung gleicher Konzentrationen von Acrylamid reproduzieren. In dieser Arbeit wurde ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel verwendet.

Die Gele wurden einzeln mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt (siehe Methode 2.9.3). Die Nachweisgrenze für Proteine mit dieser Färbung liegt bei 10 ng im Vergleich zur Silberfärbung, die bereits 0,1 ng Protein nachweisen kann. Vorteil der Färbung mit kolloidalem Coomassie ist die Möglichkeit der massenspektrometrischen Untersuchung einzelner Proteinspots aus den gefärbten Gelen.

Ein Problem der Methode stellte der Vergleich der einzelnen Gele dar. Die Proteinspots lagen nicht genau übereinander, so dass eine Auswertung mit der Software Delta2D von Decodon erfolgte. Die Ursachen hierfür könnten z.T. in der Gewinnung des Gesamtproteins, welche an verschiedenen Tagen mit selbst hergestellten Lösungen unterschiedlichen Datums durchgeführt wurde, liegen. Ein Einfluss auf die Proteinex-

pression kann nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Ursache stellt die Gelelektrophorese selbst dar. Es konnten immer nur zwei Gele parallel gegossen, sowie eine Elektrophorese durchgeführt werden. Auch hier sind Einflüsse von Umgebungstemperatur, Pufferlösungen unterschiedlichen Datums nicht auszuschließen. Eine Möglichkeit die Einflussfaktoren auf die Gelelektrophorese zu vermindern wäre die Technik der „ 2D difference in-gel electrophoresis“ (2D-DIGE), welche eine simultane Auftrennung mehrerer Proben gleichzeitig in einem Gel erlaubt, die jedoch bisher nicht etabiliert ist.

Die Identifizierung der Proteinspots wurde mit der Methode nanoLC-ESI-MS/MS (LC = Liquid Chromotography, ESI = Electrospray Ionization, MS = Mass Spectrometry) von der Proteome Factory AG durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine hochsensitive Proteinidentifizierung, welche sich u.a. sehr gut für Proteinbanden aus PAGE Gelen eignet. Standardmäßig erfolgt eine Datenbanksuche gegen die NCBInr Proteindatenbank (siehe www.proteomefactory.com).

Um eine Anwendung der Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen auf die Verhältnisse *in vivo* gewährleisten zu können, wurde die Cytarabin-Konzentration von 10 mg/l gewählt, dies entspricht 41,1 μM/l und liegt damit im Bereich der *in vivo* bei der Hochdosistherapie mit Cytarabin erreichten Konzentrationen von 10 - 140 μM/l.

Proteinspot 01 wurde als Mangan-Superoxiddismutase identifiziert. Die Superoxiddismutase ist ein Metalloenzym wobei drei Typen unterschieden werden. Die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (SodC), die Eisen-Superoxiddismutase (SodB) und die bei dieser Arbeit identifizierte Mangan-Superoxiddismutase (SodA). Das Enzym Superoxiddismutase katalysiert die Reaktion von Superoxid-Molekülen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff ($2O_2^{-\cdot} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) und ist ein Hauptabwehrmechanismus von Zellen gegen oxidativem Stress und bekannter Pathogenitätsfaktor einiger Bakterien [8, 11].

Oxidativer Stress bezeichnet die reaktiven Sauerstoffderivate, welche z.B. bei der inkompletten Reduktion von Sauerstoff während der Atmung entstehen. Zu den reaktiven Sauerstoffderivaten zählt neben dem oben genannten Superoxid auch das Wasserstoffperoxid und das Hydroxyradikal ($OH^{\cdot}$), diese haben mehrere schädliche Effekte auf

lebende Organismen, wie die Schädigung von DNA, RNA, Proteinen und Lipiden. Bakterien die unter aeroben Bedingungen wachsen, benötigen Mechanismen, enzymatische und nichtenzymatische, um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken. Es stehen verschiedene enzymatische Mechanismen zur Verfügung, bekannt sind u.a. die Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase. Streptokokken fehlt das Enzym Katalase, wodurch der Superoxiddismutase eine größere Rolle bei der Bewältigung des oxidativen Stress zufällt [52, 67].

Die Rolle der Mangan-Superoxiddismutase in der Pathogenese von Infektionskrankheiten verschiedenster Erreger, darunter *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae* und *Haemophilus influenzae*[11, 52, 67], wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Eine wichtige Rolle spielt die Superoxiddismutase dabei für das Überleben der Bakterien in Phagozyten, was Experimente mit *sodA*(Gen kodiert für Mangan-Superoxiddismutase)-Deletären Mutanten zeigten [8].

Es wurde gezeigt, dass die Expression des *sodA*-Gens und die Aktivität der Mn-SOD bei erhöhtem Sauerstoffangebot steigt und damit abhängig von der Konzentration des Superoxids ist [8, 11]. Die Sauerstoff-Bedingungen der Bakterienkulturen welche zur Gewinnung des Proteoms verwendet wurden, waren in beiden Gruppen gleich. Die Übernacht-Kulturen wurden jeweils mit und ohne Cytarabin bei 37°C im 5% CO_2 Brutschrank hergestellt. Das weitere Wachstum fand im 37°C Brutschrank und Atmosphäre, ohne erhöhte Sauerstoffzufuhr statt. Eine Veränderung der Mn-SOD Expression kann daher auf den Einfluss von Cytarabin zurückgeführt werden.

Desweiteren wurde ein Einfluss der Wachstumsphase auf die Mn-SOD beschrieben [8]. Es zeigte sich eine erhöhte Mn-SOD Aktivität während der postexponentiellen Wachstumsphase. Die Kulturen wurden stets bis zu einer OD_{600} von 0,6 $\pm$ 0,1 bebrütet, welches der exponentiellen Wachstumsphase entspricht. Ein Einfluss der Wachstumsphase auf die veränderte Mn-SOD Expression kann daher ausgeschlossen werden.

In der hier durchgeführten Untersuchung zeigte sich eine Inhibierung des Enzyms Superoxiddismutase durch Cytarabin. Das Ursache-Wirkungsprinzip ist unklar. Reguliert Cytarabin die Mn-SOD Expression herunter, wären die Bakterien der Wirkung

des Superoxids vermehrt ausgesetzt, was zu einer Schädigung der Bakterien führen würde und damit ein vermehrtes Absterben und eine verminderte Pathogenität der Bakterien bedeuten würde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Cytarabin zu einer verminderten Sauerstoffspannung führt und die Bakterien daher die Mn-SOD Expression senken, wobei die folgenden Reaktionsprodukte wie Wasserstoffperoxid, welche ebenfalls toxisch für die Bakterien sind, weniger anfallen, woraus eine erhöhte Keimdichte und damit eine potentiell erhöhte Pathogenität von *Streptococcus mitis* unter Einfluss von Cytarabin resultiert.

Proteinspot 02 wurde als Pyruvatoxidase identifiziert. Die Pyruvatoxidase (SpxB) ist ein bekannter Pathogenitätsfaktor in *Streptococcus pneumoniae* [62]. SpxB bildet ein homo-tetramer und benötigt Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Thiaminpyrophosphat (TPP) und Magnesium als Kofaktoren. Sie katalysiert die Reaktion im aeroben Stoffwechsel von Pyruvat zu Acetylphosphat, wobei Wasserstoffperoxid und Kohlendioxid freiwerden ($Pyruvat \rightarrow Acetylphosphat + H_2O_2 + CO_2$) [48, 55, 62].

Die bisherigen Studien, welche SpxB charakterisieren wurden hauptsächlich mit *Streptococcus pneumoniae* einem häufigen Humanpathogen durchgeführt. *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus mitis* sind eng verwandt, was durch die außergewöhnlich hohe Sequenzidentität der 16SrRNA von *Streptococcus mitis, Streptococcus oralis* und *Streptococcus pneumoniae*, die zu mehr als 99% identisch ist, gut dokumentiert ist [14, 31]. Eine Übertragung der Erkenntnisse über SpxB von *Streptococcus pneumoniae* auf *Streptococcus mitis* ist daher teilweise möglich. Wasserstoffperoxid, das Nebenprodukt der SpxB-Reaktion bei aerobem Wachstum, ist toxisch. Zum eine wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid die Wirtszellen schädigt [12], zum anderen führt es zum Absterben anderer Bakterien wie es für *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wurde [54] und es wurde gezeigt, dass die Bakterien selbst in der stationären Phase durch Wasserstoffperoxid abgetötet werden [55].

In dieser Arbeit wurde eine Reduktion von SpxB unter Einfluss von Cytarabin gefunden.

Das Ursache-Wirkungsprinzip ist auch hier unklar. Eine Erklärung wäre, dass bei

reduzierter SpxB Aktivität eine reduzierte Wasserstoffperoxid Konzentration folgt, welche durch verminderte toxische Effekte des Wasserstoffperoxids zu einer erhöhten Keimdichte und damit einer erhöhten Pathogenität führt. Zum anderen zeigte sich in einer Studie von Overweg et *al.*, dass zwei verschiedene Phänotypen von *Streptococcus pneumoniae* SpxB unterschiedlich stark exprimieren. Der Phänotyp, welcher die Fähigkeit besitzt den Nasopharynx zu Kolonisieren weist eine erhöhte SpxB Aktivität auf, wohingegen der Phänotyp, welcher eine erhöhte Pathogenität bei systemischen Infektionen aufweist, SpxB vermindert exprimiert [48]. *Streptococcus mitis* zählt zur Normalflora des Oropharynx, die Kolonisation findet bereits vor der Therapie mit Cytarabin, bei hoher SpxB Aktivität, statt. D'Mello et *al.* vermuten eine Reduktion des oxidativen Stress im peripheren Blut bei septischen Patienten, da aufgrund des verminderten Blutflusses der Sauerstoffgehalt stark erniedrigt ist. Die hier untersuchten Isolate stammen alle aus Blutkulturen erkrankter Kinder. Eine verminderte SpxB Aktivität kann *in vivo* auf den verminderten Sauerstoffgehalt und den daher reduzierten aeroben Stoffwechsel zurückgeführt werden [11]. In unserer Untersuchung wurden sämtliche Übernachtkulturen bei 37°C im 5% CO_2 Brutschrank bebrütet. Die weitere Kultivierung zur Gesamtproteingewinnung fand im 37°C Brutschrank und Atmosphäre statt (siehe Methode 2.9.1). Die Reduktion der SpxB Expression kann daher auf den Einfluss von Cytarabin zurückgeführt werden.

Sowohl für Mangan-Superoxiddismutase als auch für die Pyruvatoxidase sind indirekte Effekte auf deren Regulation möglich. Denkbar wäre auch eine Regulation über das Fibronektin-bindende Protein F, welches in *Streptococcus pyogenes* als Virulenzfaktor beschrieben ist. Oxidativer Stress führt zu einer erhöhten Superoxid Konzentration, wodurch die Protein F Expression und damit die Virulenz der Bakterien erhöht wird [16]. Auf welches der Proteine Cytarabin direkt Einfluss nimmt ist noch ungeklärt, möglich wäre eine Hemmung von SodA und SpxB, wodurch die Superoxid Konzentration steigt, welches eine Aktivierung des Fibronektin-bindenden Proteins zur Folge hätte. Auch ein direkter Effekt auf das Fibronektin-bindende Protein F und dadurch eine Reduktion des oxidativen Stress und Hemmung von SpxB und SodA wäre denkbar.

Sowohl das Enzym Superoxiddismutase, als auch das Enzym Pyruvatoxidase werden, wie die 2D-Gelelektrophorese zeigte, unter Einfluss von Cytarabin vermindert exprimiert. Da beide Enzyme Wasserstoffperoxid produzieren, wurde im Folgenden eine Methode zur Messung der Wasserstoffperoxid Konzentration mit und ohne Einfluss von Cytarabin entwickelt (siehe Methode 2.10). Aufgrund der obigen Ausführungen sollte die Wasserstoffperoxid Produktion unter Einfluss von Cytarabin unterdrückt werden.

4.5 Wasserstoffperoxid Nachweis

Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid Konzentration in einem Bakterienfiltrat wurde ein Assay, welcher auf der enzymatischen Reaktion der Meerretich-Peroxidase mit Phenolrot bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid basiert, erstellt (siehe Methode 2.10) [12, 50]. Da die Absorptionswerte an den einzelnen Messtagen Schwankungen unterlagen (Daten nicht gezeigt), wurde in jeder 96-Well-Microplatte eine Standardreihe mitgeführt. Die Standardreihen wurden mit definierten Konzentrationen Wasserstoffperoxid, im selben Puffer in der die Wasserstoffperoxid Produktion der Bakterien stattfand, hergestellt. Die enzymatische Reaktion erfolgte parallel zur enzymatischen Reaktion der Bakterienfiltrate. Eine Berechnung der Wasserstoffperoxid Konzentration aus dem Bakterienfiltrat mit Hilfe der selbst hergestellten Standardreihe war daher möglich. Die Standardkurven selbst zeigten, trotz des immer gleichen Pipettierschemas, nach Abgleich mit dem Null-Wert leicht unterschiedliche Verläufe (siehe Abbildung 3.6). Es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der Verwendung unterschiedlich alter Puffer, bzw. Puffer aus verschiedenen Ansätzen, die Messungen Abweichungen unterworfen waren. Desweiteren kann ungenaues Pipettieren der Standardreihe zu Abweichungen führen. Jedoch wurde bei nicht auswertbaren Standardreihen, z.B. aufgrund von Pipettierfehlern, der Versuch aus der Wertung genommen.

Insgesamt ist der Wasserstoffperoxid-Assay eine arbeitsaufwändige, aber leicht durchzuführende Methode.

Die Ergebnisse des Wasserstoffperoxid-Assay sind mit einem p-Wert von 0,195 nicht signifikant. Um dennoch einen Einfluss von Cytarabin auf die Wasserstoffperoxid Produktion mit statistischer Signifikanz nachweisen zu können müssten ca. 400 Proben pro Gruppe gemessen werden, dies ist aus ökonomischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden. Es zeigt sich also kein Unterschied der Wasserstoffperoxid Konzentration in Abhängigkeit von Cytarabin.

Die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese zeigten deutlich den Einfluss von Cytarabin auf die Expression zweier Enzymen, welche Wasserstoffperoxid produzieren. Die Wachstumsbedingungen beider Methoden, sowie die Cytarabin Konzentration wurden nicht verändert. Jedoch wurde für die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese nur ein Stamm (Stamm 17) verwendet, während für den Wasserstoffperoxid-Assay acht Stämme ausgewählt wurden, darunter auch Stamm 17. Dabei zeigt sich in zwei Messungen kein Unterschied, in zwei Messungen eine Erhöhung unter Einfluss von Cytarabin und in einer Messung eine verminderte Wasserstoffperoxid Produktion unter Einfluss von Cytarabin, wobei es sich bei der letztgenannten Messung um einen Ausreißer handelt. Die stark unterschiedlichen Messwerte sowohl der einzelnen Stämme untereinander, als auch zwischen den verschiedenen Stämmen, lässt auf mehrere Einflussfaktoren auf deren Expression, als nur Cytarabin, schließen.

Bei unserem Versuchsablauf (siehe Methode 2.10) wurden die Bakterien vor der Durchführung des Wasserstoffperoxid-Assays dem Cytarabin ausgesetzt, indem jeweils eine Übernacht-Kultur eines Bakterienstammes mit Cytarabin versetzt wurde. Während der Wasserstoffperoxid Produktion der Bakterien in einem speziellen Puffer wurde aus technischen Gründen keine Belastung mit Cytarabin vorgenommen. Eine Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes von Cytarabin auf die Wasserstoffperoxid Produktion von *Streptococcus mitis*, könnte in der hier verwendeten Versuchsanordnung liegen. Eine Belastung der Bakterien mit Cytarabin in der Übernacht-Kultur vermittelte keine dauerhafte, oder zu geringe, Änderung der Enzymexpression und damit der Wasserstoffperoxid Produktion.

Für das Enzym Superoxiddismutase wurde bereits bei der 2D-Gelelektrophorese

der Einfluss von Wachstumsphase und Sauerstoffangebot diskutiert (siehe 4.4). Bei der Durchführung des Wasserstoffperoxid-Assays wurde eine OD_{620} von 0,3-0,4 gewählt [12, 50]. Die Wahl einer anderen OD, könnte bereits einen Effekt auf die Enzymexpression und damit auf die Wasserstoffperoxid Produktion haben, wobei dies nicht die starken Schwankungen einzelner Messwerte erklärt. Eine veränderte Expression der Superoxiddismutase wurde außerdem in der postexponentiellen Phase beschrieben, die jedoch hier sowie bei der 2D-Gelelektrophorese nicht erreicht wurde [8].

Für das Enzym Pyruvatoxidase wurde eine veränderte Genexpression in Abhängigkeit des Bakterienstammes (verschieden Stämme von *Streptococcus pneumoniae*) und der infizierten Körperregion in einem Mausmodell (Nasopharynx, Lunge, Blut, Gehirn) gezeigt [41]. In allen untersuchten Stämmen wurde dabei eine erhöhte SpxB Expression im Nasopharynx gegenüber *in vitro* nachgewiesen. Dies unterstützt die Theorie, dass SpxB zur Kolonisation des Nasopharynx benötigt wird [62]. Desweiteren zeigte sich bei allen Stämmen eine reduzierte SpxB Expression in der Lunge und im Blut [41]. Dies ist mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zur *spxB* Expression gut vereinbar[48]. Jedoch wurde kein Unterschied auf die Genexpression von SpxB in Abhängigkeit des Phänotyps nachgewiesen [41]. Dies schließt einen Unterschied auf Proteinebene jedoch nicht aus. Mahdi et *al.* untersuchten die Expression bekannter und vermuteter Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* darunter *adcR, cbpA, cpsA, psaA* und *spxB*. Auffallend waren vor allem die extrem großen Schwankungen (Faktor 200 und mehr), die die Expression von *spxB* im Unterschied zu anderen in der Studie untersuchten Genen aufwies [41]. Die vielen Einflussfaktoren auf die Regulation von SpxB und ihre Bedeutung auf die Pathogenität der Bakterien in den verschiedenen Nischen sind zum Großteil noch unbekannt und es bedarf sicher noch einiger Untersuchungen um alle Regulationsmechanismen aufzuklären.

Die Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese durch Messung eines Reaktionsproduktes der detektierten Enzyme konnten nicht bestätigt werden. Eine Möglichkeit die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese zu bestätigen und möglichst geringe Mengen des hoch giftigen Cytarabins einzusetzen liegt in der Untersuchung auf Gen Ebene. Eine

Veränderung des Protokolls des Wasserstoffperoxid Assays um den direkten Einfluss von Cytarabin während der Phase der Wasserstoffperoxid Produktion ist aus technischen Gründen in unserem Labor nicht möglich.

Ein Einfluss von Cytarabin auf die Produktion von Wasserstoffperoxid, einem Zellgift, konnte nicht nachgewiesen werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Streptococcus mitis gehört zur Gruppe der Viridans-Streptokokken und ist Teil der Normalflora des oberen Respirationstrakts des Menschen. Bei Patienten mit maligner hämatologischer Grunderkrankung, welche mit dem Zytostatikum Cytarabin behandelt wurden, zeigten sich vermehrt Bakteriämien mit Viridans-Streptokokken, darunter vor allem *Streptococcus mitis*. Ziel dieser Arbeit war daher, den Einfluss von Cytarabin auf die Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus mitis* zu untersuchen. Dazu wurden *Streptococcus mitis*-Isolate aus Blutkulturen von Kindern mit hämatologischer Grunderkrankung untersucht.

Zu Beginn wurde das Wachstumsverhalten von *Streptococcus mitis* untersucht. Es konnte kein Wachstumsvorteil von *Streptococcus mitis* unter Cytarabin Einfluss gegenüber anderen Viridans-Streptokokken festgestellt werden.

Der Nachweis des bei *Streptococcus pneumoniae* bekannten Pathogenitätsfaktors *lytA* mittels LightCycler PCR (Polymerase Chain Reaction) gelang bei keinem der untersuchten *Streptococcus mitis*-Stämme.

Um Rückschlüsse auf den Infektionsweg ziehen zu können wurden alle Blutkulturisolate mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht. Es ließ sich keine Verwandschaft zwischen den Isolaten nachweisen, was für eine endogene Infektionsquelle spricht.

Der Einfluss von Cytarabin auf die Proteinexpression von *Streptococcus mitis* wur-

de mittels der Zwei-Dimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Dabei wurde unter Cytarabin Einfluss eine erniedrigte Expression der Mangan-Superoxiddismutase und der Pyruvatoxidase entdeckt. Beide Enzyme werden bei *Streptococcus pneumoniae* als Pathogenitätsfaktoren diskutiert. Beide Enzyme produzieren das Zellgift Wasserstoffperoxid, so dass ein Assay zur Detektion der Wasserstoffperoxid Produktion von *Streptococcus mitis* durchgeführt wurde. Es konnte jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Einfluss von Cytarabin auf die Wasserstoffperoxid Produktion nachgewiesen werden.

Die Regulation der Wasserstoffperoxid Produktion, ein Produkt des aeroben Stoffwechsels, ist komplex. Eine Verbindung zwischen Wasserstoffperoxid Produktion von Streptokokken und deren Pathogenität bzw. Virulenz konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. In diesem Zusammenhang kommt dem möglichen Einfluss von Cytarabin auf die Wasserstoffperoxid Produktion eine besondere Bedeutung zu. Die molekularen Mechanismen, die dem beobachteten Phänomen zugrunde liegen, müssen jedoch in weiteren detaillierten Studien geklärt werden.

Literaturverzeichnis

[1] H. S. Amash, O. R. Brown, and V. A. Padron. Protection by selective amino acid solutins against doxorubicin induced growth inhibition of *Escherichia coli*. *Gen Pharmacol.*, 26:983—987, 1995.

[2] L. Balsalobre, A. Hernández-Madrid, D. Llull, A. J. Martín-Galiano, E. García, A. Fenoll, and A. G. de la Campa. Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol.*, 44:4163—4171, 2006.

[3] D. Becton, G. V. Dahl, Y. Ravindranath, M. N. Chang, F. G. Behm, S. C. Raimondi, D. R. Head, K. C. Stine, N. J. Lacayo, B. I. Sikic, R. J. Arceci, and H. Weinstein. Randomized use of cyclosporin A (CsA) to modulate P-glycoprotein in children with AML in remission: Pediatric Oncology Group Study 9421. *Blood.*, 107:1315—1324, 2006.

[4] G. P. Bodey, V. Roriguez, H. Y. Chang, and Narboni. Fever and infection in leukemic patients: a study of 494 consecutive patients. *Cancer.*, 41:1610—1622, 1978.

[5] J. Braess, M. Fiegl, I. Lorenz, K. Waxenberger, and W. Heddemann. Modeling the pharmacodynamics of highly schedule-dependent agents: Exemplified by cytarabine-based regimens in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.*, 11:7415—7425, 2005.

[6] C. C. Chen, L. J. Teng, and T. C. Chang. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *J Clin Microbiol.*, 42:2651—2657, 2004.

[7] G. Ciarrocchi, D. G. MacPhee, L. W. Deady, and L. Tilley. Specific inhibition of the eubacterial DNA ligase by arylamino compounds. *Antimicrob Agents Chemother.*, 43:2766—2772, 1999.

[8] M. O. Clements, S. W. Watson, and S. J. Foster. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J Bacteriol.*, 181:3898—3903, 1999.

[9] D. J. DeAngelo. The treatment of adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2005:123—130, 2005.

[10] H. Döhner. Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007:412—419, 2007.

[11] R. A. D'Mello, P. R. Langford, and J. S. Kroll. Role of bacterial Mn-cofactored superoxide dismutase in oxidative stress responses, nasopharyngeal colonization, and sustained bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun.*, 65:2700—2706, 1997.

[12] P. G. Duane, J. B. Rubins, H. R. Weisel, and E. N. Janoff. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun.*, 61:4392—4397, 1993.

[13] H. P. Erba. Prognostic Factors in Elderly Patients with AML and the Implications for Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2007, 2007.

[14] R. Facklam. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.*, 15:613—630, 2002.

[15] A. S. Gamis, V. B. Howells, J. DeSwarte-Wallace, J. H. Feusner, J. D. Buckley, and W. G. Woods. Alpha hemolytic streptococcal infectio during intensive treatment for acute myeloid lekemia: A report from the Children's cancer group study CCG-2891. *J Clin Oncol.*, 18:1845—1855, 2000.

[16] C. M. Gibson and M. G. Caparon. Insertional inactivation of *Streptococcus pyogenes sod* suggests that *prtF* is regulated in response to a superoxide signal. *J Bacteriol.*, 178:4688—4695, 1996.

[17] N. Gökbuget and D. Hoelzer. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2006:133—141, 2006.

[18] S. Grant. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res.*, 72:197—233, 1998.

[19] H. F. L. Guiot, W.G. Peters, P. J. van den Broek, J. W. van der Meer, J. A. Kramps, R. Willemze, and R. van Furth. Respiratory failure elicited by streptococcal septicaemia in patients treated with cytosine arabinoside, and its prvention by penicillin. *Infection.*, 18:131—137, 1990.

[20] N. L. Harris, E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister, and C. D. Bloomfield. The world health organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, airlie house, virginia november 1997. *Mod Pathol.*, 13:193—207, 2000.

[21] L. J. Hathaway, S. Brugger, A. Martynova, S. Aebi, and K. Mühlemann. Use of the Agilent 2100 bioanalyzer for rapid and reproducible molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.*, 45:803—809, 2007.

[22] J. Hohwy, J. Reinholdt, and M. Kilian. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun.*, 69:6055–6063, 2001.

[23] T. Hoshino, T. Fujiwara, and M. Kilian. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol.*, 43:6073—6085, 2005.

[24] W.-T. Huang, L.-Y. Chang, P.-R. Hsueh, C.-Y. Lu, P.-L. Shao, F.-Y. Huang, P.-I. Lee, C.-M. Chen, C.-Y. Lee, and L.-M. Huang. Clinical features and complications of viridans streptococci bloodstream infection in pediatric hemato-oncology patients. *J Microbiol Immunol Infect.*, 40:349—354, 2007.

[25] N. Ihendyane, E. Sparrelid, B. Wretlind, M. Remberger, J. Anderssond, P. Ljungman, O. Ringden, B. H. Normark, U. Allen, DE. Low, and A. Norrby-Teglund. Viridans streptococcal septicaemia in neutropenic patients: role of proinflammatory cytokines. *Bone Marrow Transplant.*, 33:79—85, 2004.

[26] R. Jagarlamudi, L. Kumar, V. Kochupillai, A. Kapil, U. Banerjee, and S. Thulkar. Infections in acute leukemia: an analysis of 240 febrile episodes. *Med Oncol.*, 17:111—116, 2000.

[27] S. Kanno, T. Hiura, A. Shouji, Y. Osanai, M. Ujibe, and M. Ishikawa. Resistance to Ara-C up-regulates the activation of NF-kappaB, telomerase activity and Fas expression in NALM-6 cells. *Biol Pharm Bull.*, 30:2069—2074, 2007.

[28] H. F. Kennedy, D. Morrison, M. E. Kaufmann, M. S. Jackson, J. Bagg, B. E. Gibson, C. G. Gemmell, and J. R. Michie. Origins of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus oralis* causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient. *J Med Microbiol.*, 49:367—370, 2000.

[29] W. Kern, E. Kurrle, and T. Schmeiser. Streptococcal bacterimia in adult patients with leukemia undergoing aggressive chemotherapy. A review of 55 cases. *Infection.*, 18:138—145, 1990.

[30] I. Kühn, L. G. Burman, S. Haeggman, K. Tullus, and B. E. Murray. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of

DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol.*, 33:2812—2817, 1995.

[31] M. Kilian, K. Poulsen, T. Blomqvist, L. S. Håvarstein, M. Bek-Thomsen, H. Tettelin, and U. B. D. Sørensen. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS ONE*, 3:1—11, 2008.

[32] J. L. Kirchherr, G. H. Bowden, D. A. Richmond, M. J. Sheridan, K. A. Wirth, and M. F. Cole. Clonal diversity and turnover of *Streptococcus mitis* bv. 1 on shedding and nonshedding oral surfaces of human infants during the first year of life. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 12:1184–1190, 2005.

[33] S. Kishi, N. Goto, T. Nakamura, and T. Ueda. Evaluation of cell-killing effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin by a new computer-controlled *in vitro* pharmacokinetic simulation system. *Cancer Res.*, 59:2629—2634, 1999.

[34] H.-P. Lai, P.-R. Hsueh, Y.-C. Chen, P.-I. Lee, C.-Y. Lu, M.-Y. Lu, W.-C. Lin, Y.-C. Hsieh, C.-Y. Lee, K.-H. Lin, and L.-M. Huang. Bacteremiae in hematological and oncological children with febrile neutropenia: experience in a tertiary medical center in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.*, 36:197—202, 2003.

[35] C. Langebrake, I. Brinkmann, A. Teigler-Schlegel, U. Creutzig, F. Griesinger, U. Puhlmann, and D. Reinhardt. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom.*, 63B:1—9, 2005.

[36] J. C. Lefevre, G. Faucon, A. M. Sicard, and A. M. Gasc. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.*, 31:2724—2778, 1993.

[37] T. Lehrnbecher, D. Varwig, J. Kaiser, D. Reinhardt, T. Klingebiel, and U. Creutzig. Infectious complications in pediatric acute myeloid leukemia: analysis of the

prospective multi-institutional clinical trial AML-BFM 93. *Leukemia.*, 18:72—77, 2004.

[38] D. Llull, R. López, and E. García. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol.*, 44:1250—1256, 2006.

[39] H.-Z. Lu, X.-H. Weng, B. Zhu, H. Li, Y.-K. Yin, Y.-X. Zhang, D. W. Haas, and Y.-W. Tang. Major outbreak of toxic shock-like syndrome caused by *Streptococcus mitis*. *J Clin Microbiol.*, 41:3051—3055, 2003.

[40] V. S. Lucas, D. Beighton, G. J. Roberts, and S. J. Challacombe. Changes in the oral streptococcal flora of children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *J Infect.*, 35:135—141, 1997.

[41] L. K. Mahdi, A. D. Ogunniyi, K. S. LeMessurier, and J. C. Paton. Pneumococcal virulence gene expression and host cytokine profiles during pathogenesis of invasive disease. *Infect Immun.*, 76:646—657, 2008.

[42] G. Marcucci, J. C. Byrd, G. Dai, M. I. Klisovic, P. J. Kourlas, D. C. Young, S. R. Cataland, D. B. Fisher, D. Lucas, K. K. Chan, P. Porcu, Z.-P. Lin, S. F. Farag, S. R. Frankel, J. A. Zwiebel, E. H. Kraut, S. P. Balcerzak, C. D. Bloomfield, M. R. Grever, and M. A. Caligiuri. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood.*, 101:425—432, 2003.

[43] J. C. McAvin, P. A. Reilly, R. M. Roudabush, W. J. Barnes, A. Salmen, G. W. Jackson, K. K. Beninga, A. Astorga, F. K. McCleskey, W. B. Huff, D. Niemeyer, and K. L. Lohmann. Sensitive and specific method of rapid identification or *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.*, 39:3446—3450, 2001.

[44] B. E. Murray, K. V. Singh, J. D. Heath, B. R. Sharma, and G. M. Weinstock. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol*, 28:2059—2063, 1990.

[45] A. Nyhlén, B. Ljungberg, I. Nilsson-Ehle, and I. Odenholt. Bactericidal effect of combinations of antibiotic and antineoplastic agents against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Chemotherapy.*, 48:71—77, 2002.

[46] P. H. O'Farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.*, 250:4007—4021, 1975.

[47] Y. Okamoto, P. C. Ribeiro, D. K. Srivastava, J. L. Shenep, C.-H. Pui, and B. I. Razzouk. Viridans streptococcal sepsis: Clinical features and complications in childhood acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.*, 25:696—703, 2003.

[48] K. Overweg, C. D. Pericone, G. G. C. Verhoef, J. N. Weiser, H. D. Meiring, AD P. J. M. De Jong, R. De Groot, and P. W. M. Hermans. Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.*, 68:4604—4610, 2000.

[49] C. D. Pericone, K. Overweg, P. W. M. Hermans, and J. N. Weiser. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.*, 68:3990—3997, 2000.

[50] E. Pick and Y. Keisari. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.*, 38:161—170, 1980.

[51] S. M. Poutanen, J. de Azavedo, B. M. Willey, D. E. Low, and K. S. MacDonald. Molecular characterization of multidrug resistance in *Streptococcus mitis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:1505–1507, 1999.

[52] C. Poyart, E. Pellegrini, O. Gaillot, C. Boumaila, M. Baptista, and P. Trieu-Cuot. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.*, 69:5098—5106, 2001.

[53] C.-H. Pui and W. E. Evans. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.*, 354:166—178, 2002.

[54] G. Regev-Yochay, K. Trczinski, C. M. Thompson, R. Malley, and M. Lipsitch. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.*, 188:4996—5001, 2006.

[55] G. Regev-Yochay, K. Trzcinski, C. M. Thompson, M. Lipsitch, and R. Malley. SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selctive advantage in an in vivo competitive colonization model. *J Bacteriol.*, 189:6532—6539, 2007.

[56] A. F. Reilly and B. J. Lange. Infections with viridans group streptococi in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer.*, 49:774—780, 2007.

[57] J. M. Rowe. Innovative approaches in the treatment and support of patients with acute myelogenous leukemia. *Oncologist.*, 12:1, 2007.

[58] T. J. Ruescher, A. Sodeifi, S. J. Scrivani, L. B. Kaban, and S. T. Sonis. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Cancer.*, 82:2275—2281, 1998.

[59] A. L. Shapiro, E. Vinuela, and J. V. Jr. Maizel. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.*, 28:815—820, 1967.

[60] C. L. Sheppard, T. G. Harrison, R. Morris, A. Hogan, and R. C. George. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of

Streptococcus pneumoniae DNA in clinical samples. *J Med Microbiol.*, 53:189—195, 2004.

[61] R. S. Singer, W. M. Sischo, and T. E. Carpenter. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.*, 42:5502—5511, 2004.

[62] B. Spellerberg, D. R. Cundell, J. Sandros, B. J. Pearce, I. Idänpään-Heikkilä, C. Rosenow, and H. R. Masure. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.*, 19:803—813, 1996.

[63] F. C. Tenover, R. D. Arbeit, R. V. Goehring, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-fiel gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.*, 33:2233—2239, 1995.

[64] K. Tokuda, J.-I. Nishi, M. Yoshinaga, O. Ijichi, N. Ikarimoto, A. Shii, S. Etoh, T. Fukushige, A. Mogi, K. Kawakami, and K. Miyata. Sepsis and meningitis due to penicillin-resistant viridans streptococci in neutropenic children. *Pediatr Int.*, 42:174—177, 2000.

[65] A. M. Whatmore, A. Efstratiou, A. P. Pickerill, K. Broughton, G. Woodard, D. Sturgeon, R. George, and C. G. Dowson. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of "atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun.*, 68:1374—1382, 2000.

[66] H. Wisplinghoff, R. R. Reinert, O. Cornely, and H. Seifert. Molecular relationships and antimicrobial susceptibilities of viridans group streptococci isolated from blood of neutropenic cancer patients. *J Clin Microbiol.*, 37:1876—1880, 1999.

[67] H. Yesilkaya, A. Kadioglu, N. Gingles, J. E. Alexander, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.*, 68:2819—2826, 2000.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Strukturformel Cytarabin 6

3.1 Pulsfeldgelelektrophorese 54
3.2 2D-Gelelektrophorese gefärbt mit Coomassie Brillant Blue 56
3.3 Spot 01 Master-Gel 57
3.4 Spot 02 Master-Gel 57
3.5 Wasserstoffperoxid Konzentrationen 60
3.6 Standardreihen Wasserstoffperoxid-Assay 61
3.7 Wasserstoffperoxid-Assay Box-Whisker-Plots (mit / ohne)AraC 63
3.8 Wasserstoffperoxid-Assay Histogramm 63
3.9 Wasserstoffperoxid-Assay Histogramm t-Verteilung 63

Tabellenverzeichnis

2.1 Bakterienstämme aus Blutkulturen der Kinderklinik 18
2.2 *Streptococcus oralis*-Isolate aus der Universitätsklinik Ulm 19
2.3 Pipettierschema Reihenverdünnungstest 31
2.4 Programm der Pulsfeldgelelektrophorese 37
2.5 Pipettierschema isoelektrische Fokussierung 41
2.6 Programm zur Fokussierung 42
2.7 Pipettierschema Standardreihe Wasserstoffperoxid-Versuch 48
2.8 Schema Wasserstoffperoxid-Versuch 49

3.1 Ergebnisse des Reihenverdünnungstests 52
3.2 DNA-Konzentrationen 53
3.3 Proteinkonzentrationen 55
3.4 Tabellarische Auswertung der einzelnen 2D-Polyacrylamidgele 58
3.5 Tabellarische Auswertung der Mastergele der 2D-Polyacrylamidgele . . 59
3.6 Wasserstoffperoxid statistische Maßzahlen 62

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Barbara Spellerberg** für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Einblicke in das spannende Gebiet der experimentellen Forschung. Ihre konstruktive Kritik zur Durchführung der Versuche waren eine große Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau **Melanie Kuhn** und Frau **Dipl. biol. Simone Aymanns** für die Einarbeitung in die Labortechniken bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau **Beate Wirths** für die Durchführung der Light-Cycler PCR und bei Frau **Angelika Möricke** für die Anleitung bei der Durchführung der PFGE.

Ich Danke allen Mitarbeitern der Abteilung für die freundliche Aufnahme, die Hilfsbereitschaft und die vielen aufmunternden Worte, wenn die Versuche nicht gelingen wollten.

Ich Danke meinen Eltern für die Ermöglichung dieses Studiums und für die Unterstützung während meiner Promotion.