

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz Lungenzentrum  
Programmbereich Infektion  
Direktor: Prof. Dr. Ulrich Schaible  
Forschungsgruppe: Bioanalytische Chemie  
Leiter: PD Dr. Dominik Schwudke

---

**Strukturanalytische Untersuchungen zur Biosynthese, Modifikation  
und Quantifizierung von Teichonsäuren in  
*Streptococcus pneumoniae***

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Franziska Waldow  
aus Bergen

Lübeck 2018

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Ulrich Schaible
2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Lars Redecke

Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.10.2018

---

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung – „The captain of all the men death“</b>	<b>9</b>
1.1	Die Pneumokokken-Zellwand	11
1.2	Die verschiedenen LTA-Strukturen in Gram-positiven Bakterien	13
1.3	Die Biosynthese der Pneumokokken-Teichonsäuren	16
1.4	Vergleich der LTA-Strukturen von <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. oralis</i>	19
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>21</b>
	<b>Resultate und Diskussion</b>	<b>21</b>
3.	Identifizierung der Lipoteichonsäure-Ligase (Tacl)	22
4.	Hydrolyse und Anheftung der Phosphorylcholin-Substituenten in Teichonsäuren von <i>S. pneumoniae</i>	28
4.1	Spezifische Hydrolyse der <i>P</i> -Cho-Substituenten durch die Phosphorylcholine Esterase (Pce)	32
4.2	LicD2 katalysiert die spezifische <i>P</i> -Cho-Anheftung am $\beta$ -D-GalpNAc	39
5.	Strukturuntersuchung der LTA aus zwei Cholin-unabhängigen <i>S. pneumoniae</i> Stämmen	44
5.1	Strukturanalysen der LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho <sup>-</sup>	47
5.2	Strukturanalysen der LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho <sup>licA64</sup>	52
6.	Etablierung einer Methode zur Trennung der LTA nach Kettenlänge	57
6.1	Untersuchungen zur Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels RP-18-HPLC	57
6.2	Chromatographische Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels HPAEC-PAD	60
6.3	Anwendung des HPAEC-PAD-System auf die LTA von TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2	63
7.	Untersuchungen hinsichtlich des LTA/WTA-Verhältnisses in der <i>S. pneumoniae</i> Zellwand mittels GC/MS	66
7.1	Untersuchungen des LTA/WTA-Verhältnisses für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ cps	69
7.2	Anwendung der Quantifizierungsmethode auf die TacL-Deletionsstämme	74
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>

---

<b>9.</b>	<b>Experimentaltteil</b>	<b>79</b>
9.1	Geräte	79
9.2	Chemikalien	80
9.3	Verbrauchsmaterial	81
9.4	Methoden	82
9.4.1	Mutantenkonstruktion und Bakterienanzucht	82
9.4.2	Aufarbeitung LTA und WTA	83
9.4.3	Extraktion und Isolierung der LTA	84
9.4.4	Fluorwasserstoff-Behandlung	87
9.4.5	Hydrazin-Behandlung von LTA	87
9.4.6	<i>In vitro</i> -Behandlung von LTA mit Phosphorylcholin Esterase	88
9.4.7	Extraktion und Isolierung von PGN-WTA	89
9.4.8	Enzymverdau mit LytA	90
9.4.9	Chromatographische Trennung von Teichonsäuren nach Kettenlänge	91
9.4.9.1	Trennung der LTA nach Kettenlänge mit der Reversed Phase (RP)-18-HPLC	91
9.4.9.2	Chromatographische Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels HPAEC-PAD	92
9.4.9.3	Entsalzen der Fraktionen mittels GPC	94
9.4.9.4	Entsalzen der Fraktionen mittels Dialyse	94
9.5	NMR-Spektroskopie	95
9.6	Massenspektrometrie	95
9.6.1	Elektrospray Ionisation Fourier-Transformation Ionenzyklotron Resonanz Massenspektrometrie	95
9.6.2	Q-Exactive Massenspektrometrie	96
9.7	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	96
9.7.1.	Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung	95
<b>10.</b>	<b>NMR Datensätze</b>	<b>99</b>
10.1	TIGR4 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>pce</i>	99
10.2	TIGR4 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>licD2</i>	101
10.3	TIGR4 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>pce</i> $\Delta$ <i>licD2</i>	103
10.4	D39Cho <sup>-</sup>	105
10.5	D39Cho <sup>-</sup> <i>licA64</i>	107
<b>11.</b>	<b>Aufgearbeitete Stämme inklusive Auswaage</b>	<b>109</b>

---

<b>12.</b>	<b>GC/MS Auswertung Quantifizierung</b>	<b>111</b>
12.1	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> – Unabhängige Kultur 1	111
12.2	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> – Unabhängige Kultur 2	113
12.3	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> – Unabhängige Kultur 3	115
12.4	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>tacl</i> – Unabhängige Kultur 1	117
12.5	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>tacl</i> – Unabhängige Kultur 2	119
12.6	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>tacl</i> pBAV1C- <i>tacl</i> – Unabhängige Kultur 1	121
12.7	<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>tacl</i> pBAV1C- <i>tacl</i> – Unabhängige Kultur 2	123
<b>13.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>14.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>15.</b>	<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>136</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>140</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>141</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>143</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>144</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure, engl. amino acid
AATGal	2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
<i>C. canimorsus</i>	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
CDP	Cytidindiphosphat
CBP	Cholin-Bindeproteine
COSY	Correlated Spectroscopy
CRP	C-reaktives Protein
$\delta$	chemische Verschiebung (NMR); Einheit: ppm
d	Dublett (NMR)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-FT-ICR-MS	Elektrospray Ionisation Fourier-Transformation Ionenzyklotron Resonanz Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
GC	Gaschromatographie
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GroP	Glycerolphosphat

---

GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	Stunden
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
K	Kelvin
KPSI	Kilopounds per square inch
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LM	Laufmittel
LytA	<i>N</i> -Acetylmuramyl–L-Alanin Amidase
LytB	$\beta$ - <i>N</i> -Acetylglukosaminidase
LytC	$\beta$ - <i>N</i> -Acetylmuramidase
M	Molar
$\mu$	mikro
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
MP-H <sub>2</sub> O	Millipor Wasser
MS	Massenspektrometrie
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. Nuclear Magnetic Resonance
ORF	offener Leserahmen, engl. open reading frame
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

---

P-Cho	Phosphorylcholin
Pce	Phosphorylcholin Esterase
PGN	Peptidoglykan
pnLTA	Pneumokokken-LTA
RboP	Ribitolphosphat
RU	repetitive Einheiten, engl. Repeating Unit
RNase	Ribonuklease
RP	Umkehrphase, engl. Reversed Phase
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. Sodium dodecyl sulfate
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pseudopneumoniae</i>	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>
TA	Teichonsäure, engl. teichoic acid
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
Und-PP	Undecaprenyl-diphosphat
ÜS	Überstand
UZ	Ultrazentrifuge
WTA	Wandteichonsäure
vs.	versus

z.B.	zum Beispiel
ZM	Zytoplasmamembran

---

„Das ist es, was wir in meinem Labor am University College erforschen: Streptokokken. In manchen Labors werden verschiedene Bakterien erforscht, bei uns nicht. Natürlich erforschen wir mehr als einen Bakterienstamm. Aber nur von Streptokokken. Mein besonderes Interesse gilt den Streptokokken, die virale Meningitis bei Neugeborenen verursachen.“

(Elizabeth George, Nur eine Böse Tat – Ein Inspector-Lynley-Roman, Seite 608)

...

„Ah ja, verstehe. Aber lassen Sie mich eines fragen: Welchem Zweck dient es eigentlich, so gefährliche kleine Mikroben zu erforschen.“

„Das tut man, um zu verstehen, wie sie mutieren“; sagte Azhar. „Um Behandlungsmethoden zu entwickeln für den Fall einer Infektion. Es gibt viele Gründe für die Erforschung von Mikroben.“

„Und es gibt viele Arten von Mikroben, nicht wahr?“

„Sehr viele“, stimme Azhar zu. „Unzählige, und sie mutieren ständig.“

....

„Vereinfacht gesagt führen wir Untersuchungen durch, die es uns erlauben, Fragen über das Bakterium zu beantworten.“

„Fragen?“

„In Bezug auf Pathogenese, Entstehung, Entwicklung, Virulenz und Übertragung...“

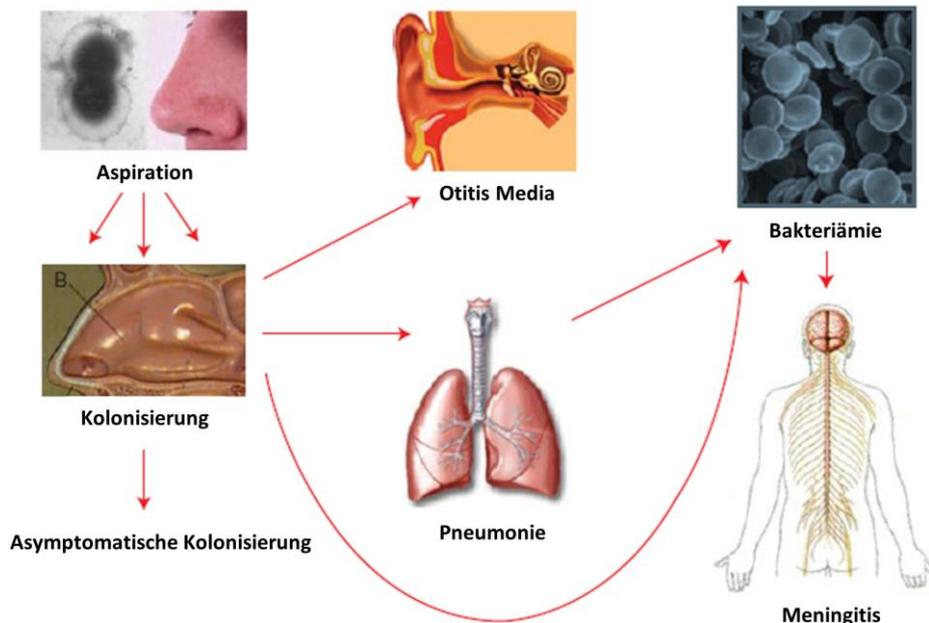
(Elizabeth George, Nur eine Böse Tat – Ein Inspector-Lynley-Roman, Seite 595-596)

## 1. Einleitung – „The captain of all the men of death“ [3]

Im Jahr 1881 beschrieben unabhängig voneinander George Miller Sternberg, ein US-amerikanischer Arzt und Pionier der Bakteriologie und Louis Pasteur, ein französischer Naturwissenschaftler und Mitbegründer der medizinischen Mikrobiologie, zeitgleich *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) als extrazellulären Erreger von Lungenentzündungen. Beide injizierten humanen Speichel in Kaninchen und untersuchten anschließend das Blut [1, 2]. Dabei verwendete G. M. Sternberg für die Untersuchung seinen eigenen Speichel und L. Pasteur den Speichel eines an Tollwut erkrankten Kindes. In beiden Fällen konnte in den Blutuntersuchungen ein Bakterium mit ovaler bis lanzettförmiger Form nachgewiesen werden. L. Pasteur bezeichnete das Bakterium als „*Microbe septicémique du salive*“ und G. M. Sternberg nannte es „*Micrococcus pasteurii*“ [1]. Hinsichtlich der Eigenschaft Lungenentzündungen hervorzurufen, benannte Julius Albert Fraenkel den Organismus bereits fünf Jahre später in *Pneumococcus* um. Untersuchungen zeigten, dass der Organismus in Paaren auftritt, woraufhin 1920 eine weitere Umbenennung in *Diplococcus pneumoniae* erfolgte. Erst 1974 erhielt das Bakterium seinen heutigen Namen *Streptococcus pneumoniae*. Diesen erhielt er aufgrund seiner Eigenschaft in flüssigem Medium zu langen Ketten zu wachsen. *S. pneumoniae* gehört zu den Gram-positiven Bakterien der Gattung *Streptococcus*, ist von ovaler bis lanzettförmiger Form und liegt meist als Diplokokken vor.

Sir William Osler, ein kanadischer Mediziner, bezeichnete vor einem Jahrhundert *S. pneumoniae* als „the captain of all the men death“ [1, 3]. Dieses Statement ist auch nach über 100 Jahren noch sehr bezeichnend, denn eine durch *S. pneumoniae* verursachte Pneumonie zählt in den Industrieländern mit zu den häufigsten Todesursachen. *S. pneumoniae* stellt außerdem die häufigste bakterielle Ursache für Erkrankungen der unteren Atemwege dar. Die von Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen reichen von mittleren Atemwegserkrankungen, wie zum Beispiel Otitis Media und Sinusitis, bis hin zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z. B. Pneumonie, Sepsis und Meningitis (siehe **Abbildung 1**).

*S. pneumoniae* ist ein häufiger Kommensale des menschlichen Nasenrachenraums. Kommt es zu einer Besiedelung der Nasennebenhöhle, kann eine Verbreitung über die Eustachische Röhre in das Mittelohr erfolgen und eine Nasennebenhöhlenentzündung (Sinusitis) oder eine Mittelohrentzündung (Otitis Media) hervorrufen [4, 5]. Des Weiteren kann *S. pneumoniae* die Lunge über den oberen respiratorischen Atmungsstrakt und die Bronchien kolonisieren, was zu einer Pneumonie führt [6-8]. Gelingt es den Pneumokokken die Luft-Blut-Schranke zu überwinden, ist es ihnen möglich sich im Organismus über den Blutkreislauf auszubreiten und eine Sepsis auszulösen [6], sowie bei Überwinden der Blut-Hirn-Schranke eine Hirnhautentzündung (Meningitis) zu verursachen [9].



**Abbildung 1: Krankheitsbilder der von Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen.** Durch Tröpfcheninfektion gelangen Pneumokokken in den Nasenrachenraum. Von dort können sie über die Eustachische Röhre das Mittelohr erreichen und eine Sinusitis oder Otitis Media auslösen. Des Weiteren können sie über den respiratorischen Atmungsstrakt über die Bronchien die Lunge erreichen, was zu einer Pneumonie führt. Ein Überwinden der Luft-Blut-Schranke und dem damit verbundenen Eindringen in das Blutssystem, kann zu einer Sepsis führen. Ein weiteres Überwinden der Blut-Hirn-Schranke löst dann eine Meningitis aus. Abbildung verändert nach [6].

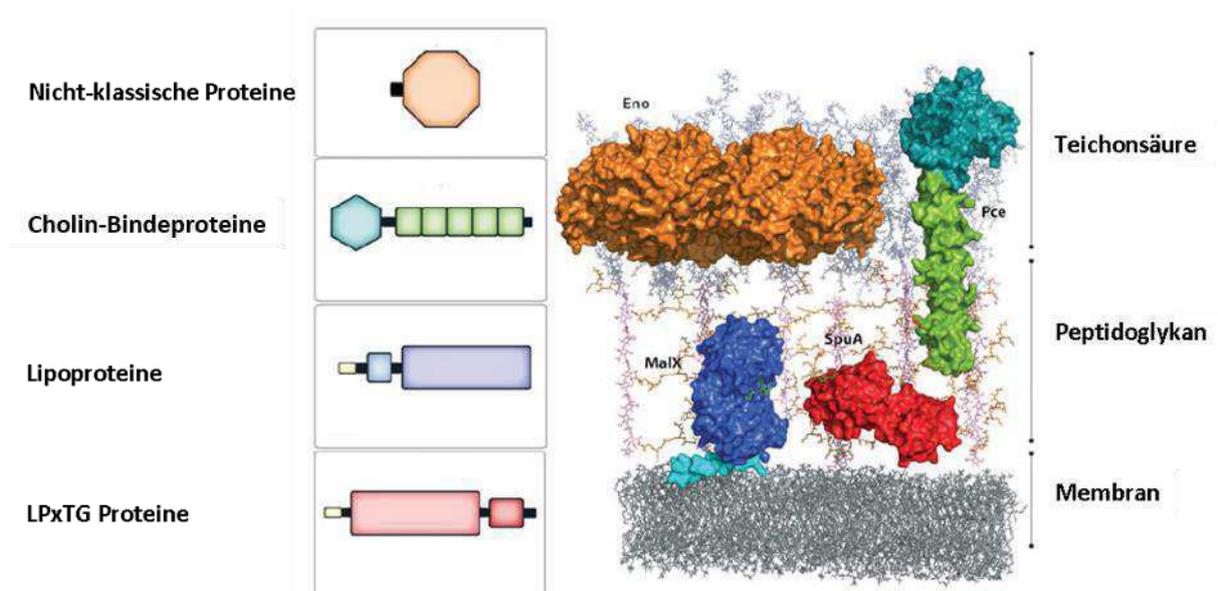
Besonders gefährdet durch die von Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen ist die Altersgruppe der unter Zweijährigen sowie der über 65-jährigen. Die WHO schätzt, dass ca. eine Million Kinder unter fünf Jahren jährlich den Folgen erliegen [10].

Ein bedeutendes Merkmal und einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* ist die Polysaccharidkapsel. Sie dient den Pneumokokken als Schutz vor dem angeborenen Immunsystem, wozu unter anderem das Komplementsystem zählt, sowie vor der Antigen-spezifischen Erkennung durch Antikörper. Auf Grundlage der verschiedenen Strukturen der Polysaccharidkapsel konnten bis jetzt 94 verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* klassifiziert werden. Die Polysaccharidkapsel besteht aus einem Polymer aus repetitiven Oligosaccharid-Einheiten, welche aus zwei bis acht Monosacchariden zusammengesetzt sind. Eine besonders starke Virulenz wird den Serotypen 1, 3, 4, 5, 6A, 6 B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F zugesprochen [11-13]. Diese 13 Serotypen sind weltweit für die meisten Pneumokokken-Erkrankungen verantwortlich. Weitere Zellwandbestandteile wie Lipopeptide und Teichonsäuren, diverse Oberflächenproteine, Pili sowie das Pneumolysin stellen zusätzliche Virulenzfaktoren der Pneumokokken dar [14, 15]. Durch Pneumokokken hervorgerufene Infektionen wurden traditionell mit Penicillin oder Ampicillin behandelt, bis in den 1960er erste Resistenzen auftraten. In den darauffolgenden Jahren ließ sich ein weiterer Anstieg der Resistenzen feststellen.

Die vermehrte Resistenzbildung von *S. pneumoniae* gegen Penicillin und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika führte zu einer vermehrten Nutzung von alternativen Medikamenten wie Macroliden, Fluoroquinolonen und anderen nicht- $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Veränderungen in der Behandlung mit Antimikrobiotika und aufkommende Pneumokokken-konjugierte Impfstoffen führten zu einem veränderten Resistenzmuster der Pneumokokken [16]. Um neue und effektive Therapien gegen Pneumokokken-Infektionen zu entwickeln, müssen Moleküle identifiziert werden, welche die Virulenz und/oder Lebensfähigkeit des Erregers entscheidend beeinflussen. Die Enzyme der Zellwandbiosynthese stellen hervorragende Zielmoleküle für eine antimikrobielle Therapie dar, da nur Bakterien mit intakter Zellwand überleben und dem Immunsystem entkommen können. Um neue Ansätze in der Antibiotika-Therapie zu entwickeln, sind umfassende Kenntnisse der Zellwand, der Wechselwirkung verschiedener Zellwand-Komponenten untereinander sowie die Biosynthesewege selbiger unerlässlich. Im Folgenden soll zunächst auf die verschiedenen Bestandteile der Pneumokokken-Zellwand eingegangen werden.

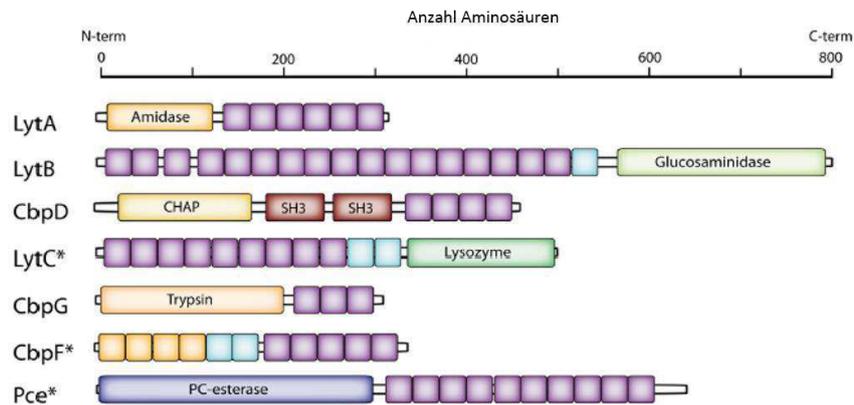
## 1.1 Die Pneumokokken-Zellwand

Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien besteht aus einer Peptidoglykan (PGN)-Schicht, die mit unterschiedlichen Zellwandbestandteilen, wie z.B. Teichonsäuren (TA) und verschiedenen Oberflächenproteinen, versehen ist. **Abbildung 2** zeigt die Zelloberfläche von *S. pneumoniae* mit seinen verschiedenen Zelloberflächenstrukturen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Zelloberfläche von Pneumokokken inklusive der unterschiedlichen Zelloberflächenstrukturen wie die PGN-Schicht, Teichonsäuren und verschiedene Oberflächenproteine. Zu den Oberflächenproteinen gehören nicht-klassische Proteine (z.B. Eno), Lipoproteine (LP) (z.B. MalX), LPxTG-Proteine (z.B. SpuA) sowie Cholin-Bindeproteine (CBPs) (z.B. Pce). Verändert nach [17].

Die PGN-Schicht setzt sich aus alternierend (1→4)-glykosidisch verknüpften *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc)-Resten zusammen. Die einzelnen GlcNAc-MurNAc-Ketten sind über Peptide an der MurNAc miteinander verbunden. Bei den Peptiden handelt es sich um Pentapeptide mit folgender Sequenz: L-Ala–D-( $\gamma$ )-Glu–L-Lys–D-Ala–D-Ala [18, 19]. Zusätzlich können die Peptide mit einer L-Ser–L-Ala oder L-Ala–L-Ala-Dipeptid-Seitenkette modifiziert sein, die an die Aminogruppe des Lysins gebunden ist [20]. Die TA unterscheiden sich außerdem hinsichtlich ihrer Verknüpfung in der Zellwand. Dabei sind die Wandteichonsäuren (WTA) kovalent an das PGN gebunden und die Lipoteichonsäuren (LTA) über einen Glykolipidanker nicht-kovalent in die Membran eingebunden. Die TA sind ein wichtiger Faktor für das Bakterienwachstum sowie die Bakterien-Fitness, tragen zum Überleben der Bakterien bei und sind in der Pathogenese involviert [21, 22]. LTA und WTA von *S. pneumoniae* sind mit Phosphorylcholin (*P*-Cho) substituiert. In den **Kapiteln 1.2** und **1.3** werden die verschiedenen TA-Strukturen sowie die Biosynthese separat betrachtet. Zusätzlich zu der PGN-Schicht und den TA von *S. pneumoniae* wurden auf der Zelloberfläche verschiedene Oberflächenproteine identifiziert. Diese werden in drei große Gruppen unterteilt: Lipoproteine mit etwa 50 identifizierten Vertretern, etwa 18 verschiedene LPxTG-Proteine, die über eine Sortase kovalent an das PGN gebunden sind und zwischen 13 und 16 Cholin-Bindeproteine (CBP). Zusätzlich wurden noch Proteine gefunden, die kein klassisches Peptid- und kein Membran-gebundenes Motiv aufweisen – hierbei handelt es sich um die nicht-klassischen Proteine [17, 23]. Im Folgenden soll ein besonderes Augenmerk auf die CBPs gelegt werden. Diese besitzen eine modulare Aufteilung, bestehend aus einem biologisch aktiven Modul und einem Cholin-Bindemodul (CBM). Das CBM ist am N- oder C-Terminus lokalisiert und dient der nicht-kovalenten Verknüpfung der CBPs an den *P*-Cho-Substituenten der TAs. Des Weiteren setzt sich das CBM aus repetitiven Einheiten von bis zu 20 Aminosäuren pro Einheit zusammen (siehe **Abbildung 3**). CBPs unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung verschiedener Module, die für unterschiedliche Funktionen der CBPs verantwortlich sind.

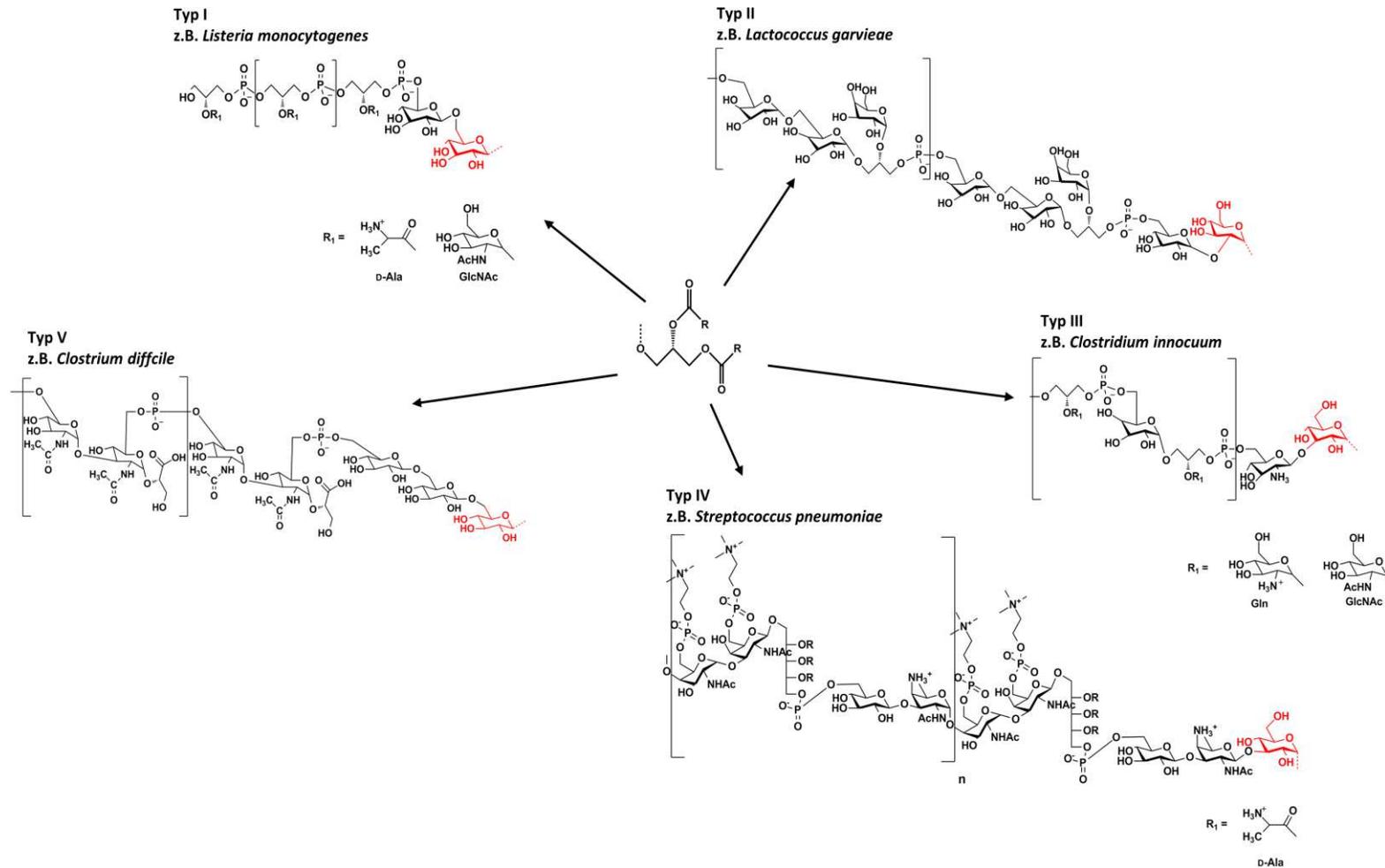


**Abbildung 3: Übersicht über die Zusammensetzung von verschiedenen CBPs, wobei lediglich eine Auswahl dargestellt ist. N- bzw. C-terminale Cholin-Bindedomäne; Nicht-kanonische Sequenz, Nicht-kanonische Sequenz. \* Proteine, deren drei dimensionale Struktur aufgeklärt wurde. Verändert nach [17].**

Aufgrund der verschiedenen zusammengesetzten Module ist nicht genau geklärt, welche *P*-Cho-Substituenten für die nicht-kovalente Bindung der CBPs essenziell sind. Beispiele für CBPs sind unter anderen vier Zellwandhydrolyasen, die entscheidend zur Virulenz beitragen: die *N*-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase (LytA) (siehe **Kapitel 9.4.8**), die  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase (LytB), die  $\beta$ -*N*-Acetylmuramidase (LytC) und die Phosphorylcholin Esterase (Pce) (siehe **Kapitel 4** und **9.4.6**) [23]. Der Pce wird eine kritische Funktion in der Virulenz sowie in der Invasivität nachgesagt [19, 24-26].

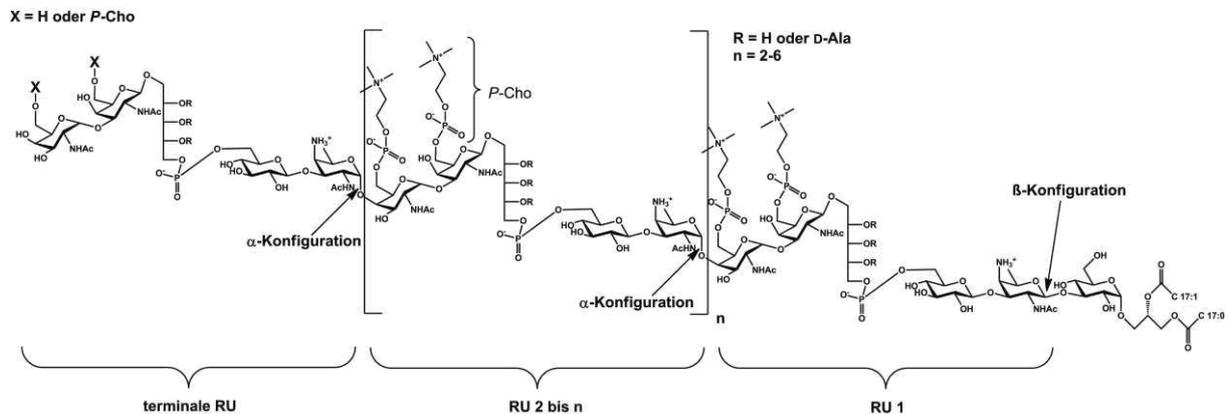
## 1.2 Die verschiedenen LTA-Strukturen in Gram-positiven Bakterien

J. Baddiley et al. führten 1958, ausgehend von dem griechischen Wort „teichos“ für Wand, den Begriff Teichonsäuren (TA) ein. Dabei beschreibt das Wort „teichos“ die bakterielle Zellwand sowie die Membran und Kapselpolymere, welche ein Glycerolphosphat- oder ein Ribitolphosphat-Grundgerüst besitzen [27, 28]. Schnell wurde entdeckt, dass auf struktureller Ebene eine große Diversität vorlag. In Gram-positiven Bakterien beschreibt der Begriff TA zwei Zellwandpolymere. Zum einen die Wandteichonsäuren (WTA) und zum anderen die Lipoteichonsäuren (LTA). Anhand ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur kann die LTA in fünf verschiedene Typen eingeteilt werden [29]. Die Gemeinsamkeit der fünf LTA-Typen ist die Verankerung über ein Glykolipid, bestehend aus einem mit verschiedenen Fettsäuren veresterten Glycerol. Die **Abbildung 4** zeigt eine Übersicht über die verschiedenen LTA-Typen inklusive beispielhafter Stämme in denen sie gefunden wurden. In den letzten Jahren erfolgten insbesondere Strukturuntersuchungen an dem LTA-Typen I (z.B. in *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* [30-32]) sowie an dem LTA-Typen IV (z.B. in *S. pneumoniae* [33, 34]).



**Abbildung 4: Übersicht über die fünf verschiedenen LTA-Typen.** Allen LTA-Typen gemeinsam ist die Verankerung über ein Glykolipid. Der Ankerzucker in den jeweiligen LT-Typen ist in Rot dargestellt. An den jeweiligen LTA-Typen können zusätzlich weitere Reste, wie z.B. D-Alanin (siehe Typ I und IV) angebunden sein. An dem Glykolipidanker sind verschiedene Fettsäuren verestert (R), für *S. pneumoniae* sind dies z.B. Fettsäuren 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0 und 18:1. Abbildung verändert nach [29]

Untersuchungen zeigten, dass auch innerhalb eines LTA-Typus strukturähnliche Typen in genetisch sehr eng verwandten Mikroorganismen vorkommen. Als Beispiel sei die LTA-Struktur von *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) und von *S. pneumoniae* genannt, die beide dem LTA-Typ IV angehören. Ein detaillierter Vergleich der LTA-Strukturen von *S. pneumoniae* und *S. oralis* erfolgt im **Kapitel 1.4**. In dieser Arbeit wird ein besonderes Augenmerk auf die LTA vom Typ IV, insbesondere auf *S. pneumoniae* gelegt werden. Erste Untersuchungen an Pneumokokken-LTA (pnLTA) erfolgten durch W. F. Goebel et al. im Jahr 1943, von dem sie als F-Antigen beschrieben wurden [35, 36]. Erste Strukturuntersuchungen mit Hilfe von Massenspektrometrie (MS) sowie ein entsprechendes Strukturmodell für pnLTA wurden jedoch erst 1992 von T. Behr et al. veröffentlicht [37]. Das aktuelle Strukturmodell wurde mit hochauflösender NMR sowie MS aufgestellt, und 2013 publiziert [34]. NMR-Untersuchungen bewiesen, dass innerhalb der ersten RU die 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (AATGal) eine  $\beta$ -Konfiguration und innerhalb der folgenden RU (RU 2 bis n) sowie in der terminalen RU eine  $\alpha$ -Konfiguration aufweist (siehe **Abbildung 5**). Des Weiteren konnte in den Massenspektren eine Verteilung der Kettenlänge von vier bis acht RU beobachtet werden [34]. Eine Besonderheit von *S. pneumoniae* im Gegensatz zu anderen Gram-positiven Bakterien ist die identische Struktur innerhalb der *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten von LTA und WTA [38]. Der Unterschied liegt lediglich in der Verankerung in der Zellwand (siehe **Kapitel 1.1**).

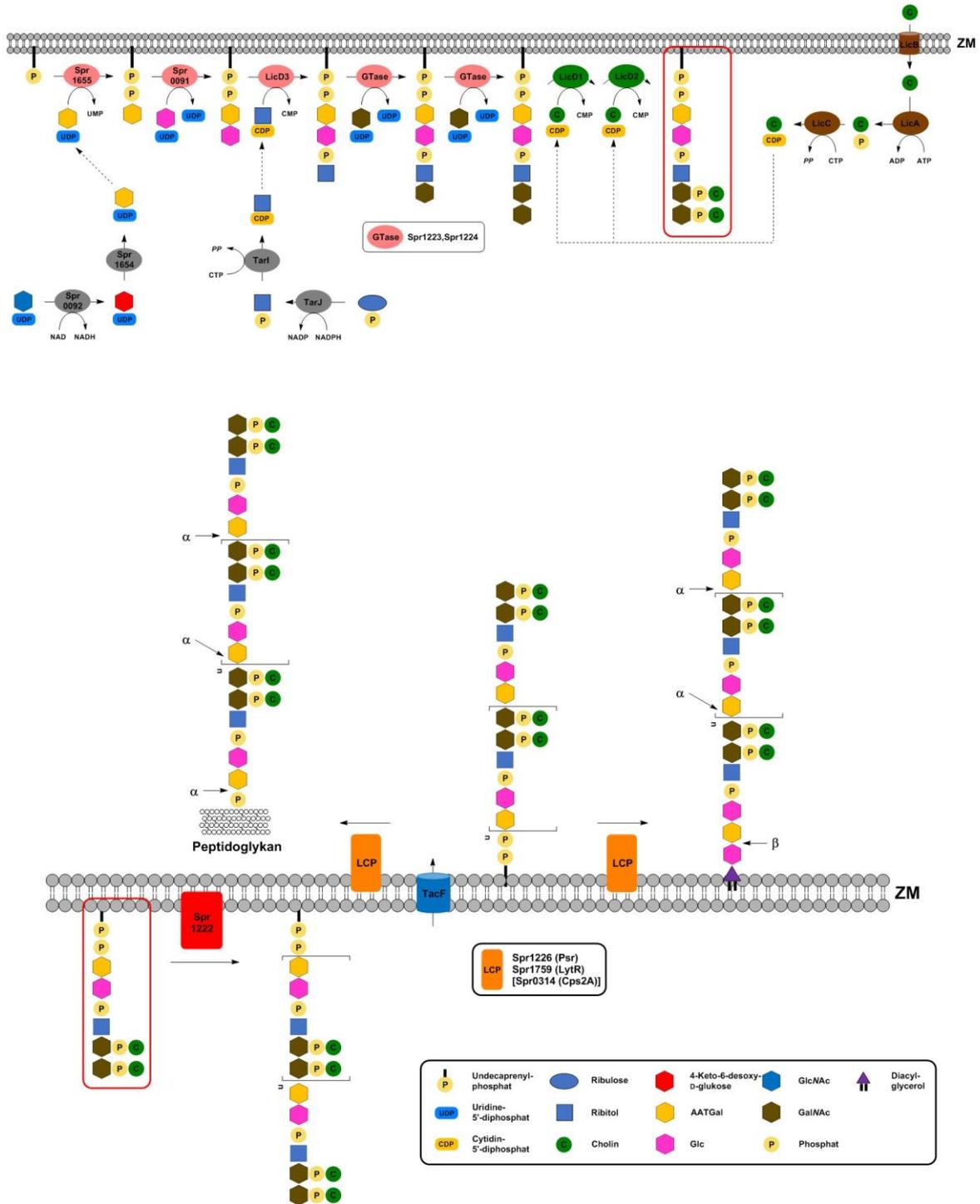


**Abbildung 5: Aktuelles Strukturmodell der Pneumokokken-LTA von *S. pneumoniae* [34].** Die LTA besteht aus repetitiven *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten mit der folgenden Struktur:  $(\rightarrow 4)\text{-}6\text{-}O\text{-}P\text{-}Cho\text{-}\alpha\text{-}D\text{-}GalpNAc\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}6\text{-}O\text{-}P\text{-}Cho\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GalpNAc\text{-}(1\rightarrow 1)\text{-}Rib\text{-}ol\text{-}5\text{-}P\text{-}(O\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcP\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}AATGalp(1\rightarrow)$ . Die Verknüpfung zum Glykolipidanker erfolgt über ein  $\beta$ -konfiguriertes AATGal an  $(\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-}GlcP\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}acyl_2Gro$  [34].

Aufgrund der gleichen Struktur von LTA und WTA in *S. pneumoniae* wurde, auf Grundlage von bioinformatischen Untersuchungen, auf einen gemeinsamen Biosyntheseweg sowie auf einen gemeinsamen Vorläufer geschlossen. Im Folgenden soll die Biosynthese der Pneumokokken-TA genauer erläutert werden.

### 1.3 Die Biosynthese der Pneumokokken-Teichonsäuren

In der Arbeit von D. Denapaitte et al. wurden anhand von bioinformatischen Untersuchungen des Genoms des *S. pneumoniae* Stammes R6 eine Vorhersage des Biosyntheseweges von LTA und des PGN-WTA-Komplexes getroffen [39]. Der komplette Biosyntheseweg der TA aus *S. pneumoniae* ist in **Abbildung 6** dargestellt. Dabei stammen die Bezeichnungen der dargestellten Gene bzw. Proteine aus dem *S. pneumoniae* Stamm R6. Der initiale Schritt der Biosynthese (siehe **Abbildung 6**) wird durch die Übertragung von AATGalp-1-phosphat auf ein Undecaprenylphosphat (Und-P) vollzogen. Für diese Übertragung ist zuvor eine Aktivierung der AATGal nötig, welche über die Bindung an Uridindiphosphat (UDP) erfolgt. Wie bereits zuvor erwähnt, bestehen die TA aus repetitiven Einheiten (RU), deren Beginn die AATGal darstellt. Zurzeit ist die Konfiguration der AATGal ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) in diesem Zellwandvorläufer nicht geklärt. Katalysiert wird die Übertragung der AATGal durch das Protein Spr\_1655. Studien von M. J. Coyne et al. wiesen darauf hin, dass das Protein Spr\_1655 eine 44%ige Sequenzidentität zum Protein Wcfs von *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) aufweist. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Protein Wcfs in *B. fragilis* in der Kapselbiosynthese die Übertragung der AATGal katalysiert [40]. Zwei Fakten ließen erkennen, dass das Protein in *S. pneumoniae* im Vergleich zum *B. fragilis* nicht in der Kapselsynthese sondern in der TA-Biosynthese involviert ist: *spr1655* wird nicht von weiteren in der Kapselbiosynthese involvierten Genen flankiert. Außerdem konnte das Gen in verschiedensten *S. pneumoniae* Stämmen, also unabhängig vom Serotyp und damit unabhängig von der Kapselstruktur, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren eindeutige Hinweise darauf, dass Spr\_1655 die AATGal-Übertragung in der TA-Biosynthese bei *S. pneumoniae* katalysiert. Im Anschluss erfolgt die Übertragung von Glukose, Ribitol-Phosphat sowie der zwei GalpNAc-Reste. Untersuchungen zeigten, dass das Gen *spr0091* für eine Glykosyltransferase kodiert, die für die Übertragung von Glukose verantwortlich ist. Im nächsten Schritt erfolgt der Transfer eines Ribitol-Phosphats, katalysiert durch LicD3, von einem CDP-Ribitol auf die Glukose. Um die Übertragung von Ribitol zu ermöglichen, ist zuvor eine Aktivierung mittels TarI und TarJ [41] nötig, die in der *lic1/lic2*-Region von *S. pneumoniae* lokalisiert sind. Bei der *lic1/lic2*-Region handelt es sich um ein TA-Gencluster mit acht Genen in einer chromosomalen Region, welche für unterschiedliche Genprodukte kodieren und an unterschiedlichen Schritten der TA-Biosynthese beteiligt sind. Anschließend erfolgt die Übertragung der zwei GalpNAc-Reste durch zwei Glykosyltransferasen, Spr\_1223 und Spr\_1224. An die O-6-Position der beiden GalpNAc Reste werden im Anschluss die P-Cho durch die Proteine LicD1 und LicD2 angebunden. Für die Anheftung der P-Cho-Substituenten erfolgen zuvor die Aufnahme sowie die Aktivierung von exogenem Cholin, wobei *S. pneumoniae* auf die Anwesenheit von exogenem Cholin angewiesen ist und nicht in der Lage ist dies selbst zu bilden.



**Abbildung 6: Vorgeschlagnene Biosynthese der LTA und des PGN-WTA-Komplexes von *S. pneumoniae*.** Dargestellt sind Enzyme des Metabolismus (LicB, LicA, LicC) und der Anheftung (LicD1, LicD2) von Cholin, der Synthese und Polymerisation des Und-PP-pseudo-Pentasaccharid-Vorläufers (roter Kasten), sowie dessen Transports durch die Membran mittels TacF. Farbcode der Gene und Proteine für verschiedene Biosyntheseschritte: grau = Bildung des TA Vorläufers mit einer RU; pink = Biosynthese des Vorläufers; braun = Cholin-Aufnahme und -Metabolismus; grün = Anheftung des P-Cho-Substituenten; rot = Polymerisation des Vorläufers; blau = Transport durch die Zellmembran; orange = Phosphotransferasen. ZM = Zytoplasmamembran. Verändert nach [39].

Die Aufnahme und Aktivierung des exogenen Cholins erfolgt mittels drei weiterer Proteinen aus der *lic1/lic2*-Region (LicB, LicA, LicC). Dabei ist das Membrantransportprotein LicB für die Aufnahme von Cholin verantwortlich [42]. Im Zytoplasma erfolgt anschließend die Phosphorylierung des Cholins durch die Kinase LicA [43] sowie die Aktivierung zu CDP-Cholin mittels der Cytidylyl-Transferase LicC [44, 45]. Ausgehend vom aktivierten Substrat CDP-Cholin wird dann das *P*-Cho mittels LicD1 und LicD2 auf die GalpNAc-Reste übertragen. LicD1 ist im Gegensatz zu LicD2 für das Bakterium essenziell [46]. Wie spezifisch die Anheftung der *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -D-GalpNAc durch LicD1 und LicD2 erfolgt, ist Teil der vorliegenden Arbeit (siehe **Kapitel 2** und **Kapitel 4.2**). Die nun vollständig mit *P*-Cho substituierte *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit (siehe roter Kasten in der **Abbildung 6**) wird im nächsten Schritt polymerisiert. Dabei kodiert wahrscheinlich das Gen *spr1222* für eine Polymerase. Anschließend erfolgt der Transport des vollständig substituierten und polymerisierten Und-*PP*-TA-Vorläufers (siehe **Abbildung 6**) durch die Zytoplasmamembran (ZM) mit Hilfe des Transmembranproteins TacF (Teichoic Acid Flippase, Spr\_1150). Dabei lässt sich TacF zu einer Gruppe von orthologen Proteinen (engl. Cluster of orthologous groups of proteins, COG2244) zuordnen, welche für den Transport durch die Membran von O-Antigen-Vorläufer in Gram-negative Bakterien und TAs in Gram-positive Bakterien verantwortlich sind [47]. Grundsätzlich wird den Proteinen in dieser speziellen Gruppe von orthologen Proteinen eine Funktion als Transmembran-Transporter für Lipid-verknüpfte Kohlenhydratstrukturen zugeordnet. In *E. coli* sind dies beispielsweise die Proteine Wzx und WzxE, die eine O-Antigen Flippase [48] bzw. eine Lipid III Flippase [49] darstellen. Anschließend erfolgt die Anheftung des Vorläufers an das PGN, welches in der Bildung des PGN-WTA-Komplexes resultiert. Des Weiteren wird der Vorläufer an den Glykolipidanker angeheftet, was zu der Bildung der LTA führt. In der Literatur wird angenommen, dass die Anheftung des Vorläufers an das PGN, die Anheftung an den Glykolipidanker sowie die Anheftung der Kapsel mittels der LCP-Proteine katalysiert werden [50]. Die LCP-Proteinfamilie setzt sich aus den drei Proteinen LytR, CpsA und Psr zusammen, denen eine semi-redundante Aktivität zugesprochen wird [51]. Des Weiteren handelt es sich bei den LCP-Proteinen um Phosphotransferasen. In *S. aureus* führt die Abwesenheit der orthologen Gene zu einer Absonderung der WTA in das extrazelluläre Medium, sowie zu einem reduzierten Phosphatgehalt in der Zellhülle [52]. Wie im **Kapitel 1.2** erläutert, weist die LTA in der ersten RU eine  $\beta$ -Konfiguration der AATGal auf (siehe **Abbildung 5**). Im Gegensatz dazu ist die AATGal innerhalb der RU  $\alpha$ -konfiguriert (siehe **Abbildung 5**) [34]. Im Vorfeld von Dr. Nicolas Gisch durchgeführte strukturchemische Untersuchungen der pnWTA zeigten dagegen eine  $\alpha$ -Konfiguration der AATGal in der ersten RU. Dies ließ darauf schließen, dass der TA-Vorläufer für die WTA-Synthese mit einem Phosphat unter Erhalt der  $\alpha$ -Konfiguration im AATGal mit Hilfe der LCP-Proteinfamilie auf das Peptidoglykan übertragen wird. Bei dem TA-Vorläufer handelt es sich um ein Und-*PP*. Dieser wird ohne Phosphat und unter Änderung der Konfiguration von  $\alpha$  zu  $\beta$  auf den Glykolipidanker übertragen, was zur Bildung der LTA führt. Aufgrund

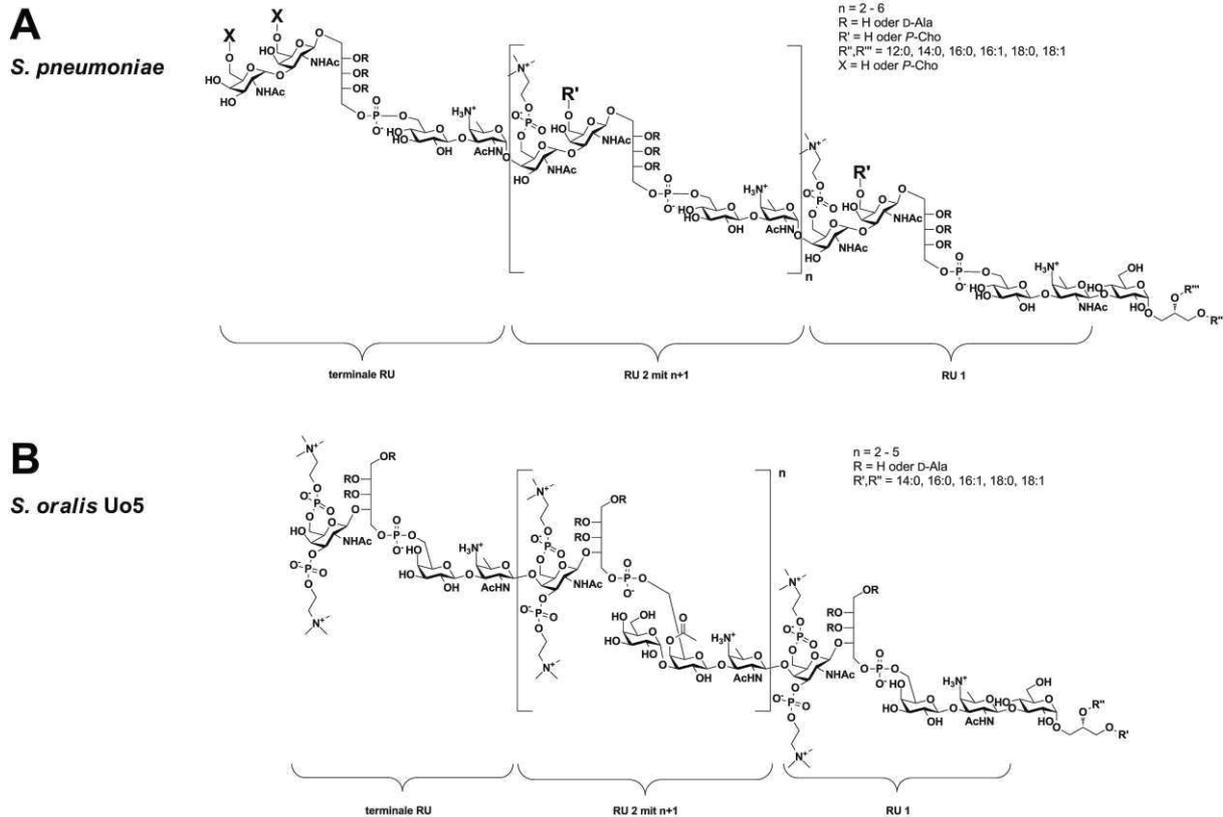
der Konfigurations-Änderung in der AATGal sowie der Übertragung des Und-PP-Vorläufers ohne Phosphat, ist eine Beteiligung der LCP-Proteine fragwürdig. Ein Vergleich mit anderen Organismen, z.B. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (*P. aeruginosa*) und *E. coli* K12, zeigte eine chemisch vergleichbare Reaktion zur LTA-Anheftung. In *P. aeruginosa* PAO1 und *E. coli* K12 liegt beispielsweise in der LPS-Biosynthese ein Und-PP-O-Antigen-Vorläufer vor. Dieser Und-PP-O-Antigen-Vorläufer wird unter Änderung der Konfiguration ( $\alpha \rightarrow \beta$ ) ohne Phosphat auf die Kern-Region übertragen. WaaL, eine invertierende Glykosyltransferase, katalysiert diese Reaktion [53]. Ein Vergleich der Genomsequenz des für die WaaL kodierenden Gens in *P. aeruginosa* PAO1 mit dem SPD\_1672 im *S. pneumoniae* D39 zeigte eine 18,6%ige Sequenzidentität sowie eine 24%ige Identität und 49,2%ige Ähnlichkeit mit der katalytischen, periplasmatischen Loop-Domäne [54].

Dieses Protein ist in Streptokokken-verwandten Organismen wie *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) B6 und *Streptococcus pseudopneumoniae* (*S. pseudopneumoniae*) VT162 ebenfalls bekannt. Die Thematik der LTA-Anheftung an den Glykolipidanker ist Teil der vorliegenden Arbeit (siehe **Kapitel 3.1**).

#### 1.4 Vergleich der LTA-Strukturen von *S. pneumoniae* und *S. oralis*

Sowohl *S. pneumoniae* als auch *S. oralis* stellen eine Besonderheit bezüglich WTA und LTA dar. Aufgrund des gemeinsamen Biosyntheseweges (siehe **Kapitel 1.3**) besitzen LTA und WTA eine nahezu identische Struktur und unterscheiden sich lediglich in ihrer Verankerung. Die LTA ist über einen Glykolipidanker an die Zellmembran angeknüpft und die WTA über ein Phosphat an die PGN-Schicht angeheftet. Wie im **Kapitel 1.2** beschrieben, besteht die LTA von *S. pneumoniae* aus repetitiven *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten. Jede Einheit setzt sich dabei wie folgt zusammen: ( $\rightarrow$ 4)-6-O-P-Cho- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O-P-Cho- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 1)-Rib-ol-5-P-(O-6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)-AATGalp(1 $\rightarrow$ ).

Der **Abbildung 5** sowie der **Abbildung 7** ist zu entnehmen, dass die LTA von *S. pneumoniae* ein Ribitolphosphat-Grundgerüst besitzt und zum LTA-Typ IV zugeordnet werden kann. Untersuchungen der LTA von *S. oralis* zeigten, dass diese ebenfalls ein Ribitolphosphat-Grundgerüst besitzt und zum LTA-Typ IV gehört. Ein Vergleich der LTA von *S. pneumoniae* und *S. oralis* zeigte jedoch, dass letztere in ihrer Struktur wesentlich komplexer ist; sich aus anderen Resten zusammensetzt bzw. andere Verknüpfungen vorliegen. Auch konnte in der LTA von *S. oralis* ein anderes P-Cho-Substitutionsmuster nachgewiesen werden [55]. Dabei bestehen die repetitiven Einheiten aus *pseudo*-Tetrasaccharid-Ketten. In der **Abbildung 7** sind die Strukturen der LTA von *S. pneumoniae* und *S. oralis* gegenübergestellt.



**Abbildung 7: Vergleich der LTA-Strukturen aus *S. pneumoniae* (A) und aus *S. oralis* Uo5 (B).** Die LTA aus *S. pneumoniae* setzt sich aus repetitiven *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen ( $\rightarrow 4$ )-6-*O*-*P*-Cho- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-*P*-Cho- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 1)-Rib-ol-5-*P*-(*O*-6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)-AATGalp(1 $\rightarrow$ ). Die LTA-Struktur aus *S. oralis* setzt sich aus folgenden repetitiven *pseudo*-Tetrasaccharid-Einheiten zusammen: ( $\rightarrow 4$ )-[3,6-*O*-di-*P*-Cho]- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-(1-*P* $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGalp-(1 $\rightarrow$ ). Abbildung verändert nach [55].

Als besonderer Unterschied sei zunächst hervorgehoben, dass *S. oralis* lediglich einen  $\beta$ -D-GalpNAc-Substituenten besitzt, wobei dieser sowohl an der *O*-3- als auch an der *O*-6-Position eine *P*-Cho-Substitution aufweist. Im Vergleich dazu liegt in der RU von *S. pneumoniae* ein  $\alpha$ - und ein  $\beta$ -D-GalpNAc vor, welche jeweils nur an der *O*-6-Position mit *P*-Cho substituiert sind. Ein weiterer hervorzuhebender Unterschied liegt in der Verknüpfung des Ribitolphosphats mit dem  $\beta$ -D-GalpNAc. Im Vergleich zu *S. pneumoniae*, bei dem ein 1,5-verknüpftes Ribitolphosphat vorliegt, erfolgt in *S. oralis* eine 1,2-Verknüpfung [55]. Außerdem muss hervorgehoben werden, dass in der *S. oralis* LTA eine  $\beta$ -Galaktose innerhalb der RU an die  $\beta$ -AATGal angeknüpft ist. Die Galaktose weist wiederum innerhalb der RU zwei weitere Substituenten auf, wobei an die *O*-3-Position eine weitere  $\alpha$ -D-Galp verknüpft ist und an der *O*-4-Position ein Acetylrest vorliegt.

## 2. Aufgabenstellung

Fundierte Kenntnisse der Biosynthese von Zellwand-Komponenten pathogener Bakterien hinsichtlich der beteiligten Enzyme sowie ihren entsprechenden Funktionen bilden die essentielle Grundlage um neue Angriffspunkte für Wirkstoffe zu identifizieren. Als Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen dienten die Kenntnisse zur Struktur der LTA und WTA von *S. pneumoniae*, sowie der bioinformatisch berechnete, gemeinsame Biosynthesewege dieser Zellwandpolymere [39]. Ein wichtiger Themenkomplex der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung des Proteins, welches die Anheftung des Teichonsäure-Vorläufers an den Glykolipidanker katalysiert und somit zur Bildung der LTA beiträgt. Unter Verwendung entsprechender Deletionsstämme, generiert von Nathalie Heß (Universität Greifswald), soll der strukturelle Beweis hierfür erbracht werden (siehe **Kapitel 3**).

Ein essentieller Bestandteil der Pneumokokken-TAs sind die *P*-Cho-Substituenten, da diese den nicht-kovalenten Anker für Cholin-Bindeproteine (CBPs) darstellen. Daher liegt ein weiteres Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf dem Einbau von *P*-Cho-Substituenten in die pTAs mittels LicD1 und LicD2 sowie ihrer Hydrolyse durch die Phosphorylcholin Esterase (Pce) (siehe **Kapitel 4**).

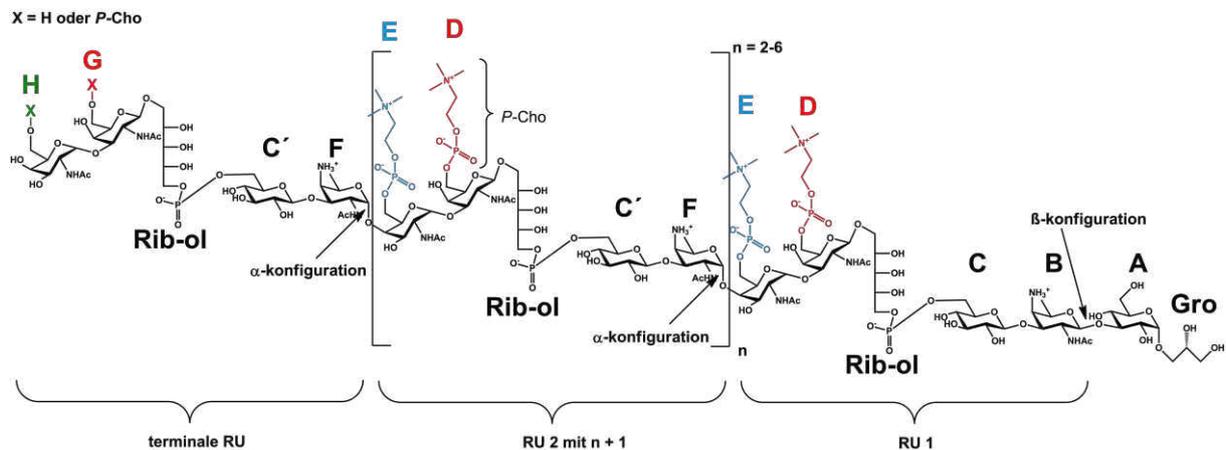
Außerdem ermöglichten Genom-Modifizierungen die Generierung von *S. pneumoniae* Stämmen mit einem aus dem *S. oralis* Stamm ATCC 35037 integrierten *licD3*-Genlokus, welche daher Cholin-unabhängige Eigenschaften aufwiesen [56]. Jedoch erfolgte an diesen Stämmen bis dato keine strukturellen Untersuchungen wie sich der Einbau des *S. oralis* ATCC 35037 *licD3*-Genlokus auf die TA-Struktur von *S. pneumoniae* auswirkt. Strukturuntersuchungen mittels NMR und MS an isolierter LTA aus den Stämmen D39Cho<sup>-</sup> und D39Cho<sup>-</sup>licA64 sollen diesen Punkt daher weiterverfolgen (siehe **Kapitel 5**).

Es ist bekannt, dass die CBPs unterschiedliche Strukturen aufweisen und unterschiedliche Domänen für die Anbindung an die TA besitzen (siehe **Kapitel 1.1**) [26, 57]. Vor diesem Hintergrund liegt es nahe, experimentelle Bindungsstudien mit unterschiedlichen CBPs und TAs durchzuführen. Für diese Bindungsstudien ist es wichtig und daher ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit, eine Methode zur Herstellung vollständig homogener TA-Moleküle zu etablieren (siehe **Kapitel 6**).

Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Verhältnis von LTA und WTA in der Pneumokokken-Zellwand. Im Jahr 1972 wurde in einer einzelnen Studie ein Verhältnis von 10:90 anhand radioaktiv-markierter Pneumokokken-Stämmen bestimmt [58]. Diese Studie sowie das auf gleiche Weise bestimmte LTA/WTA-Verhältnis für *S. oralis* (10-20:80-90) [59] stellen die bisher einzigen Arbeiten auf diesem Gebiet dar. In dieser Arbeit soll nun eine modernere, leichter zugängliche GC/MS-basierte Methode entwickelt werden, um das LTA/WTA-Verhältnis zu bestimmen (siehe **Kapitel 7**).

### 3. Identifizierung der Lipoteichonsäure-Ligase (TadL)

In den folgenden Kapiteln werden für die verschiedenen *P*-Cho-Substituenten an den TA Abkürzungen verwendet. Die jeweiligen Abkürzungen werden im Folgenden kurz beschrieben: Der *P*-Cho-Substituent am terminalen  $\alpha$ -D-GalpNAc erhält das Kürzel *P*-Cho<sub>H</sub>, der *P*-Cho-Substituent am terminalen  $\beta$ -D-GalpNAc die Abkürzung *P*-Cho<sub>G</sub>, der *P*-Cho-Substituent am  $\alpha$ -D-GalpNAc innerhalb der RU die Abkürzung *P*-Cho<sub>E</sub> und der *P*-Cho-Substituent am  $\beta$ -D-GalpNAc innerhalb der RU die Abkürzung *P*-Cho<sub>D</sub> (siehe **Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Struktur der *de*-O-acylierten LTA von *S. pneumoniae* inklusive der verwendeten Beschriftung für die verschiedenen *P*-Cho-Substituenten. Nomenklatur basierend auf [34].

Die AATGal der ersten *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit von WTA und LTA liegen in unterschiedlichen Konfigurationen vor (siehe **Kapitel 1.3**), was auf unterschiedliche Enzyme während ihrer Anheftung hindeutet. Ein Vergleich mit anderen Mikroorganismen zeigte, dass das Gen *spd\_1672* im D39- bzw. *sp\_1893* im TIGR4-Stamm einen geeigneten Kandidaten für die Anheftung der TA an den Glykolipidanker darstellt. Die Gene wurden von Nathalie Heß im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Universität Greifswald unter der Leitung von Prof. Hammerschmidt<sup>1</sup> in zwei verschiedenen *S. pneumoniae*-Serotypen deletiert sowie komplementiert. Eine detaillierte Übersicht der verwendeten Stämme mit ihren genetischen Veränderungen ist **Tabelle 1** zu entnehmen.

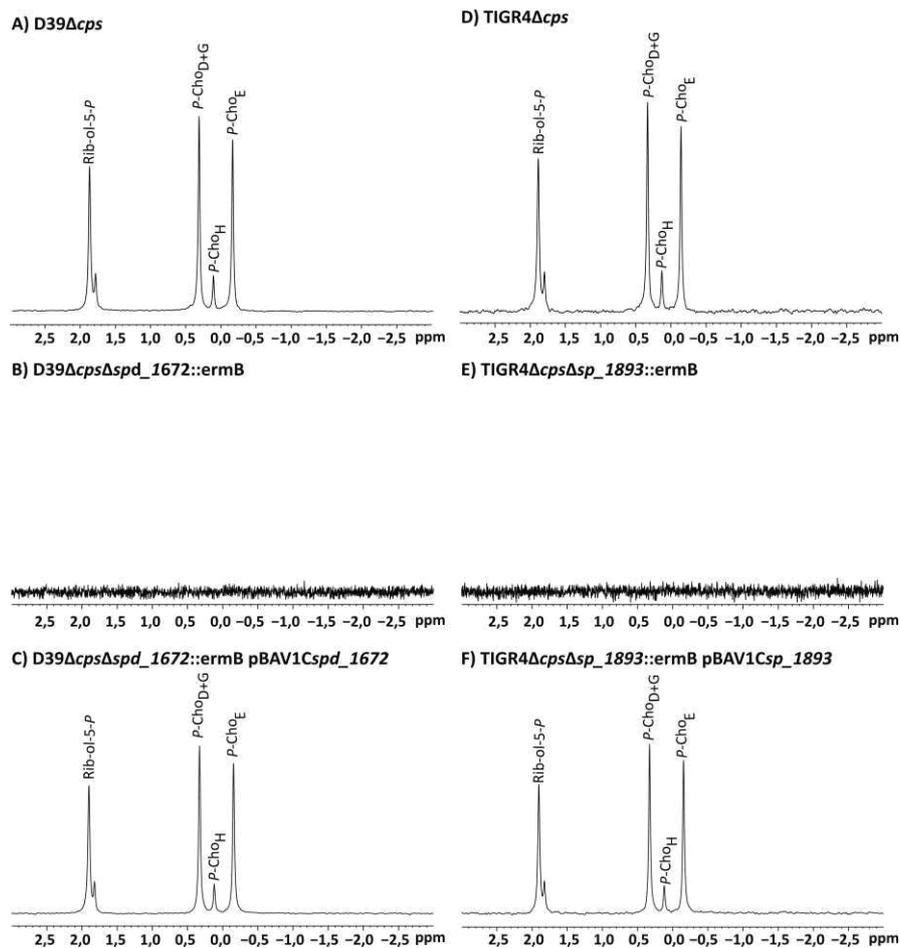
<sup>1</sup> Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete *S. pneumoniae* Stämme aus denen die LTA isoliert wurde.

Serotyp	Stamm	Antibiotika-Resistenz-Kassette	Referenz
2	D39Δ <i>cps</i>	Kanamycin	[60]
	D39Δ <i>cps</i> Δ <i>spd_1672::ermB</i>	Kanamycin Erythromycin	1
	D39Δ <i>cps</i> Δ <i>spd_1672::ermB</i> pBAV1 <i>Cspd_1672</i>	Kanamycin Erythromycin Chloramphenicol	1
	TIGR4Δ <i>cps</i>	Kanamycin	[61]
4	TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>sp_1893</i>	Kanamycin Erythromycin	1
	TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>sp_1893::ermB</i> pBAV1 <i>Csp_1893</i>	Kanamycin Erythromycin Chloramphenicol	1

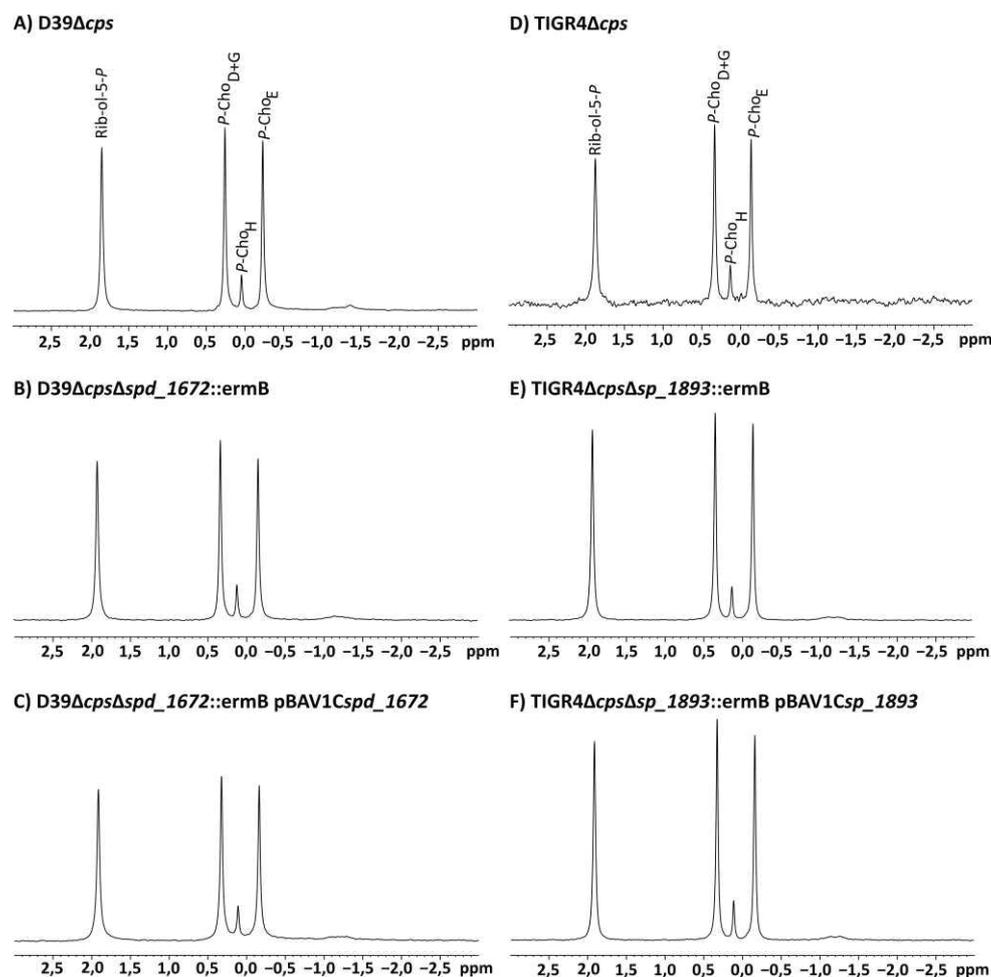
Das Zellmaterial wurde mittels French Press aufgeschlossen und anschließend die LTA vom PGN-WTA-Komplex durch mehrmalige Ultrazentrifugation voneinander separiert. Extraktion und Isolation der LTA erfolgten durch Butanol-Wasser-Extraktion, Dialyse sowie einer anschließenden chromatographischen Trennung der LTA von Lipopeptiden, dem Und-PP-TA-Vorläufer sowie von Verunreinigung mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) (siehe **Kapitel 9.4.2** und **Kapitel 9.4.3**). Während der LTA-Aufarbeitung musste besonders darauf geachtet werden, zwei unterschiedliche Säulen für die verschiedenen Serotypen zu verwenden. Zwischen den einzelnen chromatographischen Aufreinigungen mittels HIC von den Ausgangsstämmen, den Deletionsstämmen sowie den Komplementationsstämmen, erfolgte eine Regeneration der HIC mit 1 M NaOH. Unter Verwendung derselben Säule für Wildtyp, Deletionsstamm und Komplementationsstamm innerhalb eines Serotypen konnte eine potentielle Kontamination mit Bestandteilen anderer Serotypen ausgeschlossen werden. Um die LTA enthaltenen Fraktionen zu lokalisieren, wurde von den Fraktionen 20 bis 40 ein Phosphattest durchgeführt. Dabei waren die Fraktionen #29-35 in der Regel die phosphathaltigen Fraktionen, welche anschließend entsprechend vereint wurden. Ein beispielhaftes HIC-Chromatogramm sowie die dazugehörigen, phosphathaltigen Fraktionen sind in **Kapitel 9.4.3** (siehe **Abbildung 42**) dargestellt. Die Fraktionen 20 bis 40 des HIC-Laufes der Deletionsstämmen wurden mittels Phosphattests überprüft, wobei sich keine phosphathaltigen Fraktionen detektieren ließen.

Als Positivkontrolle des Testes an sich diente jedes Mal die parallel vermessene Kalibriergerade. Bei den Deletionsstämmen folgte die Vereinigung der „LTA“-Fraktionen entsprechend des unbekapselten Wildtyps (#29-35). Die fehlenden phosphathaltigen Fraktionen im Phosphattest sowie die sehr geringe Auswaage der Fraktionen, welche lediglich im  $\mu\text{g}$ -Bereich lag, waren erste Anzeichen für das Fehlen der LTA. Die Auswaagen einzelner aufgearbeiteter *S. pneumoniae* Stämme können der **Tabelle 22** und der **Tabelle 23** entnommen werden (siehe **Kapitel 11**). Im Vergleich dazu wiesen die Komplementationstämmen bei gleicher Retentionszeit wieder phosphathaltige Fraktionen in der HIC auf. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der LTA der unbekapselten Wildtypen des D39- und TIGR4-Stammes zeigten die charakteristischen Signale für Rib-ol-5-*P* ( $\delta_P = 1,84$  ppm), *P*-Cho<sub>D+G</sub> ( $\delta_P = 0,33$  ppm), *P*-Cho<sub>H</sub> ( $\delta_P = 0,13$  ppm) und *P*-Cho<sub>E</sub> ( $\delta_P = -0,14$  ppm) (siehe **Abbildung 9 A** und **D**). Diese ließen sich in den LTA-typischen Fraktionen von der HIC in beiden Deletionsstämmen nicht nachweisen (siehe **Abbildung 9 B** und **E**). Im Gegensatz dazu wiesen die beiden Komplementationstämmen im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum wieder die charakteristischen Signale für Rib-ol-5-*P* sowie für die unterschiedlichen *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc und  $\beta$ -D-GalpNAc (siehe **Abbildung 9 C** und **F**) auf.



**Abbildung 9:** Die Deletion der Gene *spd\_1672* bzw. *sp\_1893* bewirkt eine Abwesenheit der LTA. Der Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) in einem Bereich von  $\delta_P$  3-(−3) von der LTA aus dem *S. pneumoniae* D39 und TIGR4 Wildtyp (**A, D**), der Deletionsstämmen (**B, E**) sowie der Komplementationstämmen (**C, F**). Dabei können die Signale folgenden chemischen Verschiebungen zugeordnet werden: Rib-ol-5-*P*  $\delta_P = 1,84$  ppm; *P*-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_P = 0,33$  ppm; *P*-Cho<sub>H</sub>  $\delta_P = 0,13$  ppm; *P*-Cho<sub>E</sub>  $\delta_P = -0,14$  ppm.

Die Abwesenheit der phosphathaltigen Fraktionen in den HIC-Läufen der Deletionsstämmen sowie die Abwesenheit der LTA-typischen Signale in den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren bewiesen, dass die LCP-Proteine nicht verantwortlich sind für die Anheftung des TA-Vorläufers an den Glykolipidanker. Beides zeigt sehr deutlich, dass im D39-Stamm das Protein SPD\_1672 bzw. im TIGR4-Stamm das Protein SP\_1893 für die Anheftung verantwortlich ist. Um einen Einfluss der Deletion auf die WTA auszuschließen, wurde der PGN-WTA-Komplex in denselben Stämmen mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR analysiert. Um den PGN-WTA-Komplex löslich und somit für die NMR zugänglich zu machen, erfolgte zunächst eine Enzymbehandlung mit DNase, RNase und Trypsin (siehe **Kapitel 9.4.7**) sowie im Anschluss eine induzierte Hydrolyse der Peptidketten des PGN-Komplexes durch LytA (siehe **Kapitel 9.4.8**). Auch hier erfolgte ein Vergleich von den unencapselten Wildtypen (siehe **Abbildung 10 A** und **D**) mit den Deletionsstämmen (siehe **Abbildung 10 B** und **E**) und den Komplementationstämmen (siehe **Abbildung 10 C** und **F**) im D39 sowie im TIGR4. Im Gegensatz zu den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von der LTA konnte der PGN-WTA-Komplex in allen Stämmen nachgewiesen werden.



**Abbildung 10: Die Deletion der Gene *spd\_1672* bzw. *sp\_1893* zeigt keinen Einfluss auf den PGN-WTA-Komplex.** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K, 283,54 MHz) in einem Bereich von  $\delta_{\text{P}}$  3-(-3) des PGN-WTA-Komplexes von dem *S. pneumoniae* Stamm D39 und TIGR4 für den Wildtyp (**A, D**), der Deletionsstämmen (**B, E**) und der Komplementationstämmen (**C, F**). Die Signale können folgenden chemischen Verschiebungen zugeordnet werden: Rib-ol-5-P  $\delta_{\text{P}} = 1,90$  ppm; P-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,33$  ppm; P-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,12$  ppm; P-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}} = -0,15$ .

Das Vorhandensein des PGN-WTA-Komplexes in allen Stämmen (unbekapselter Wildtyp vs. Deletionsstamm vs. Komplementationsstamm) in zwei verschiedenen Serotypen beweist, dass der PGN-WTA-Komplex von der Deletion unbeeinflusst bleibt, diese jedoch einen direkten Einfluss auf die LTA-Biosynthese hat. Deshalb wurde in der zu diesem Thema verfassten Publikation [62] für die Proteine SPD\_1672 und SP\_1893 sowie ihre Homologe in anderen Stämmen ein neuer Name vorgeschlagen: Lipoteichonsäure-Ligase (engl. Lipoteichoic Acid Ligase, TaCL). Bereits 2014 wiesen K. Wu et al. auf das Protein SPD\_1672 im *S. pneumoniae* Stamm D39 hin, das bei der TA-Biosynthese mitwirkt [54]. Aufgrund von Untersuchungen im Deletionsstamm schlossen K. Wu et al. auf eine reduzierte TA-Kette. Jedoch erfolgten an dieser Stelle keine strukturellen Untersuchungen. In dieser Studie wurde das Protein SPD\_1672 im *S. pneumoniae* Stamm D39 als RafX bezeichnet.

Wie in **Kapitel 1.2** beschrieben, besitzt *S. pneumoniae* im Gegensatz zu anderen Gram-positiven Bakterien die identische *pseudo*-Pentasaccharid-Struktur innerhalb der repetitiven Einheiten für LTA und WTA. In *S. aureus* hingegen besitzt die WTA ein Ribitol-Phosphat-Grundgerüst, während in der LTA ein Glycerol-Phosphat-Grundgerüst vorliegt [63, 64]. Eine Deletion der WTA in *S. aureus* führte zu einem erhöhten Phosphat-Gehalt im Kulturmedium sowie zu einer reduzierten Adhäsion an Wirtszellen. Weiterhin ließ sich ein Einfluss der Deletion auf die Zellmorphologie beobachten [65]. Untersuchungen hinsichtlich des Zellwachstums in *S. pneumoniae* zeigten lediglich für den bekapselten D39-Stamm mit TaCL-Deletion in einem chemisch-definierten Medium einen Einfluss. Hingegen konnte in zwei verschiedenen Vollmedien für die bekapselten Stämme sowie für die unbekapselten Stämme kein Einfluss auf das Zellwachstum beobachtet werden. Weiterhin ließen sich keine Veränderungen in der Zellmorphologie bzw. in der Zellteilung im Vergleich zum Wildtyp nachweisen<sup>2,3</sup>. Die Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zu anderen Gram-positiven Spezies, die LTA hier nicht essenziell für das Wachstum und Überleben der Bakterien ist. Dies könnte an der zuvor bereits diskutierten Strukturähnlichkeit von LTA und WTA liegen. Zusätzlich sollte in Betrachtung gezogen werden, dass die LTA, wie Untersuchungen in *S. pneumoniae* und *S. oralis* zeigten [58, 59], in diesen Bakterien lediglich zu 10% im Verhältnis zur WTA vorliegt und dieser Anteil somit möglicherweise nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum und Zellmorphologie ausübt.

---

<sup>2</sup> Biologische Versuche durchgeführt von Nathalie Heß, Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland

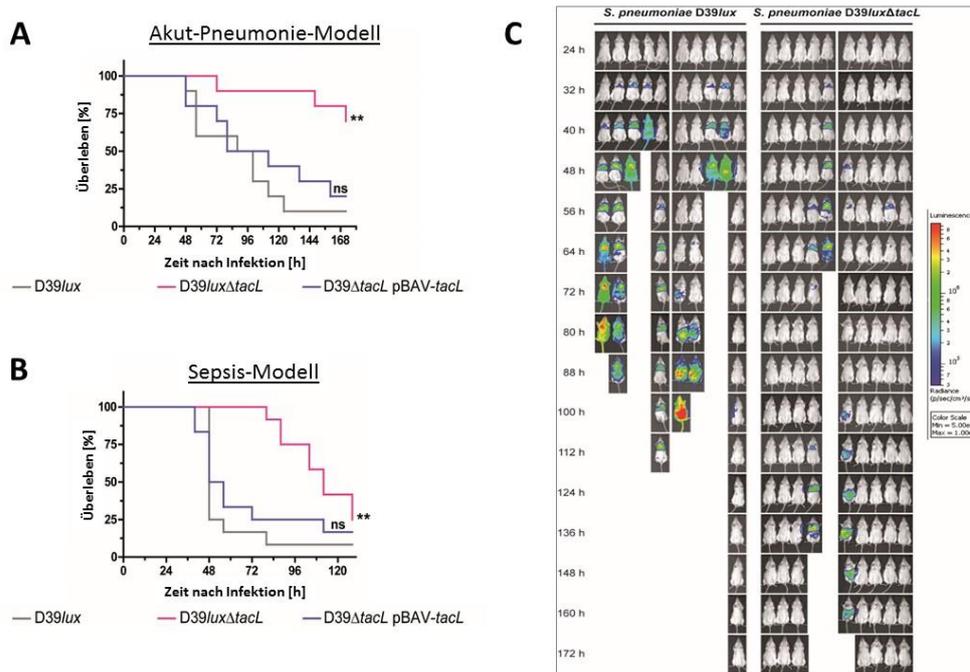
<sup>3</sup> Mikroskopie-Aufnahmen durchgeführt von Prof. Dr. Manfred Rohde, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Zentrale Einheit für Mikroskopie

Der Einfluss der TacL-Deletion wurde in zwei verschiedenen Mausmodellen<sup>4</sup>, zum einen im Akut-Pneumonie-Modell und zum anderen im Sepsis-Modell, hinsichtlich der Virulenz untersucht. Dabei wurden die entsprechenden D39-Stämme (D39, D39 $\Delta$ spd\_1672, D39 $\Delta$ spd\_1672 pBAV1C spd\_1672, D39lux, D39lux $\Delta$ spd\_1672) verwendet. In beiden Mausmodellen zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zur TacL-Deletion ein drastischer Unterschied. Im Akut-Pneumonie-Modell entwickelten im Wildtyp 90% der infizierten Mäuse eine Pneumonie, die im weiteren Verlauf zu einer Sepsis sowie zu einem anschließenden Tod der Mäuse führte (siehe **Abbildung 11 A**). Eine Infektion der Mäuse mit dem TacL-Deletionsstamm bewirkte hingegen, dass lediglich 30% der infizierten Mäuse eine Pneumonie sowie eine Sepsis entwickelten und im Versuchszeitraum starben.

Im Sepsis-Modell erfolgte eine intraperitoneale Infektion der Mäuse mit dem Wildtyp, dem Deletionsstamm sowie dem Komplementationsstamm. Wildtyp und Komplementationsstamm bewirkten den gewohnt schnellen Tod der infizierten Mäuse. Die mit dem TacL-Deletionsstamm infizierten Mäuse starben deutlich verzögert (siehe **Abbildung 11 B**). Um den Einfluss der pnLTA auf die Adhäsion an humanen Lungenepithelzellen zu beurteilen, wurden A549 Zellen mit dem D39 $\Delta$ cps-Wildtyp-Stamm, dem D39 $\Delta$ cps $\Delta$ spd\_1672-Stamm sowie D39 $\Delta$ cps $\Delta$ spd\_1672 pBAV1C spd\_1672-Stamm infiziert. Dabei konnte eine signifikant reduzierte Adhäsion der TacL-Mutante an die humanen Lungenepithelzellen beobachtet werden. Die Adhäsion im Zellsystem ließ darauf schließen, dass die fehlende LTA zu einer abgeschwächten Virulenz führt und dass der LTA eine essenzielle Rolle in der Pathophysiologie von *S. pneumoniae*-Infektionen zukommt. Die Resultate der Virulenz-Untersuchungen decken sich mit den Ergebnissen von K. Wu et al., denn auch hier konnte gezeigt werden, dass die Deletion zu einem erhöhten Überleben der infizierten Mäuse führt und folglich die LTA einen entscheidenden Einfluss auf die Virulenz ausübt [54]. Die Ergebnisse aus der Strukturuntersuchung zusammen mit den zwei unterschiedlichen Mausmodellen verdeutlichen, dass die TacL somit einen vielversprechenden Angriffspunkt für Antibiotika darstellt.

---

<sup>4</sup> Tierversuche durchgeführt von Dr. Thomas Kohler und Nathalie Heß, Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland



**Abbildung 11:** In zwei Mausmodellen zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zu den *TacL*-Deletionsstämmen ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate. **A)** Pneumonie-Modell mit einer intranasalen Infektion mit  $\sim 2,5 \cdot 10^7$  biolumineszenzen *S. pneumoniae* D39/lux Wildtyp, D39/luxΔ*tacl* und Komplementante D39Δ*tacl* pBAV1C-*tacl* sowie das dazugehörige Biolumineszenzbild in Abbildung C. **B)** Sepsis-Modell mit einer intraperitonealen Infektion mit  $\sim 3 \cdot 10^3$  biolumineszenzen D39/lux Wildtyp, D39/luxΔ*tacl* und der Komplementante D39Δ*tacl* pBAV1C-*tacl*. **C)** Biolumineszenzbild für das Pneumonie-Modell mit einer intranasalen Infektion mit  $\sim 2,5 \cdot 10^7$  biolumineszenzen *S. pneumoniae* D39/lux Wildtyp und Komplementante D39Δ*tacl* pBAV1C-*tacl*.

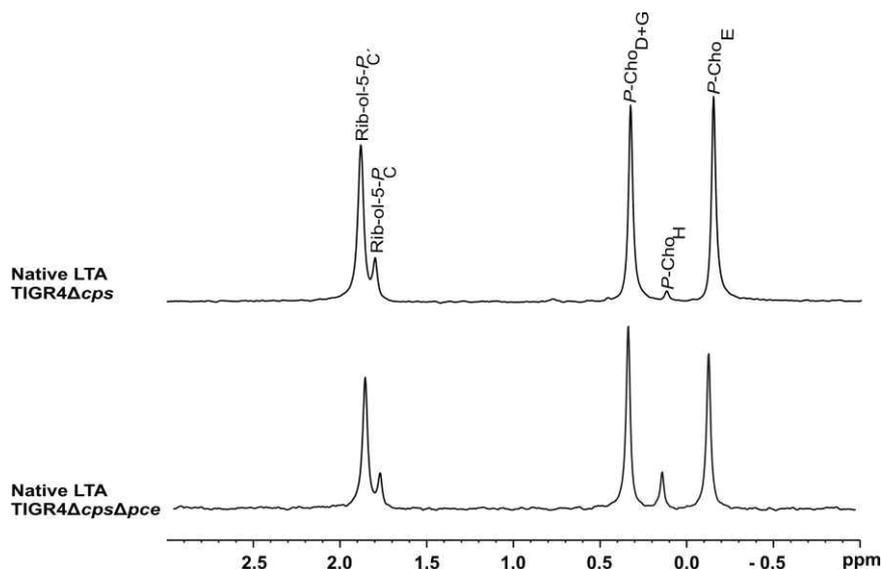
Es ist bekannt, dass die *P*-Cho-Substituenten der TA durch Komponenten des Immunsystems wie beispielsweise das C-reaktive Protein (CRP) und dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF)-Rezeptor erkannt werden [24, 66, 67]. Die *Pce*-induzierte Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten führt zu einer späteren Erkennung vom Immunsystem [68]. Wie spezifisch die Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten von den TAs durch die *Pce* erfolgt, wird im nachfolgenden **Kapitel 4** betrachtet.

#### 4. Hydrolyse und Anheftung der Phosphorylcholin-Substituenten in Teichonsäuren von *S. pneumoniae*

N. Gisch und T. Kohler konnten bereits in früheren Studien mittels <sup>31</sup>P-NMR-Strukturuntersuchungen zeigen, dass die terminalen *P*-Cho-Substituenten vom  $\alpha$ -D-GalpNAc und  $\beta$ -D-GalpNAc im TIGR4Δ*cps* (pH 6,5) im Vergleich zur LTA von D39Δ*cps*Δ*lgt* hydrolysiert werden [34]. Des Weiteren zeigten sich auch innerhalb der LTA vom TIGR4Δ*cps* Unterschiede in der *P*-Cho-Substitution. Erfolgte die Anzucht der Bakterien bei pH 6,5 war der Terminus (*P*-Cho<sub>H</sub>, *P*-Cho<sub>G</sub> in **Abbildung 8**) höchstens mit einem *P*-Cho substituiert. Im Gegensatz dazu wies die LTA, wenn sie in demselben Stamm allerdings bei einem pH-Wert von 7,4 kultiviert und isoliert wurde, einen vollständig substituierten Terminus auf. Es ist bekannt, dass *in vitro* bis zu 30% der *P*-Cho-Substituenten der TA von der Phosphorylcholin Esterase (*Pce*)

hydrolysiert werden [69]. Bereits 1974 konnte die Pce zu der Gruppe der Cholin-Bindeproteine (CBPs) zugeordnet und die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden [70]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt lagen keine Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität dieser Hydrolyse vor.

Im Labor von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, erfolgte zunächst die Deletion der Pce in einem *S. pneumoniae* Serotyp 4-Stamm, im speziellen im Stamm TIGR4 $\Delta$ cps. Analysen der isolierten LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce zeigten im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum sowie im Massenspektrum ein vollständiges *P*-Cho-Substitutionsmuster. Die Signale im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von der de-*O*-acylierten LTA vom TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce ließen sich wie folgt zu den verschiedenen Substituenten zuordnen: Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 0,33 ppm dem *P*-Cho-Substituenten vom  $\beta$ -D-GalpNAc (Reste **D** und **G**, siehe **Abbildung 12**, oberes Spektrum), das Signal bei 0,13 ppm dem *P*-Cho-Substituenten von der terminalen  $\alpha$ -D-GalpNAc (Rest **H**, oberes Spektrum) und das Signal bei -0,15 ppm lässt sich dem *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc (Rest **E**, siehe **Abbildung 12**, oberes Spektrum) zuordnen. Eine vollständige Tabelle der chemischen Verschiebungen für die LTA aus TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce ist dem **Kapitel 10.1** zu entnehmen.



**Abbildung 12:** Die Pce-Deletion im *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 bewirkt eine vollständige *P*-Cho-Substitution der LTA. Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_P$  (3-(-1);  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ cps (oberes Spektrum) mit der dazugehörigen Struktur und pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce (unteres Spektrum). Die Signale lassen sich wie folgt zu ordnen: Rib-ol-5- $P_C$ :  $\delta_P = 1,89$  ppm; Rib-ol-5- $P_C$ :  $\delta_P = 1,80$  ppm;  $P\text{-Cho}_{D+G}$ :  $\delta_P = 0,33$  ppm;  $P\text{-Cho}_H$ :  $\delta_P = 0,13$  ppm;  $P\text{-Cho}_E$ :  $\delta_P = -0,15$  ppm.

MS-Analysen zeigten deutlich (siehe **Abbildung 13**), dass in der de-*O*-acylierten LTA ein vollständiges *P*-Cho-Substitutionsmuster vorliegt. Im dazugehörigen Massenspektrum ließen sich die berechneten molekularen Massen für eine vollständige *P*-Cho-Substitution nachweisen, was für 5 RU 6746,34 Da, für 6 RU 8044,78 Da und für 7 RU 9343,23 Da entspricht (siehe **Abbildung 13**). Grundsätzlich waren im Massenspektrum der LTA vom TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce die typische Verteilung der Kettenlängen zu sehen [71], wobei auch hier die Ketten mit 6 bzw. 7 RU am häufigsten vorkamen.

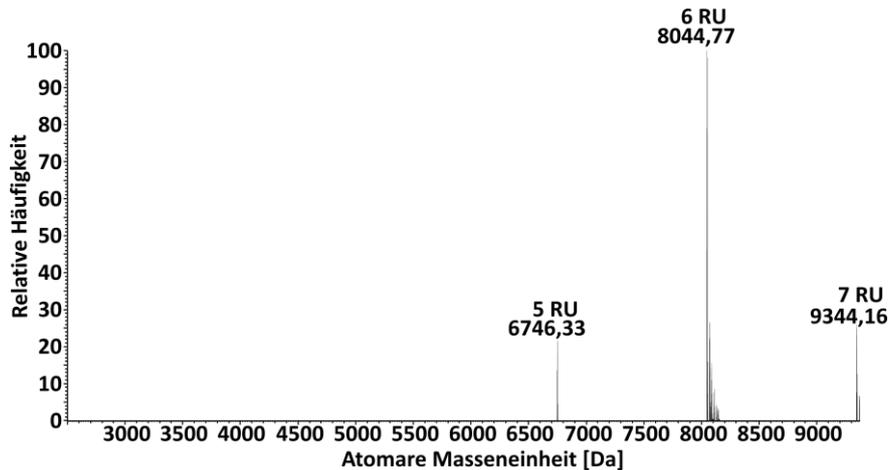


Abbildung 13: Das Massenspektrum des Pce-Deletionsstammes TIGR4ΔcpsΔpce zeigt die Massen für eine vollständige P-Cho-Substitution der LTA. Im Massenspektrum ist ein Bereich von 2500-9400 Da dargestellt. Dabei entsprechen die gemessenen molekularen Massen folgenden Kettenlängen: 5 RU = 6746,33 Da; 6 RU = 8044,77 Da; 7 RU = 9344,16 Da.

Ein Vergleich der gemessenen Massen für die verschiedenen Kettenlängen mit den berechneten Massen ergab eine hohe Genauigkeit (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2: Vergleich der berechneten und gemessenen molekularen Massen sowie die Massengenauigkeit für die de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4ΔcpsΔpce. \*Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak.

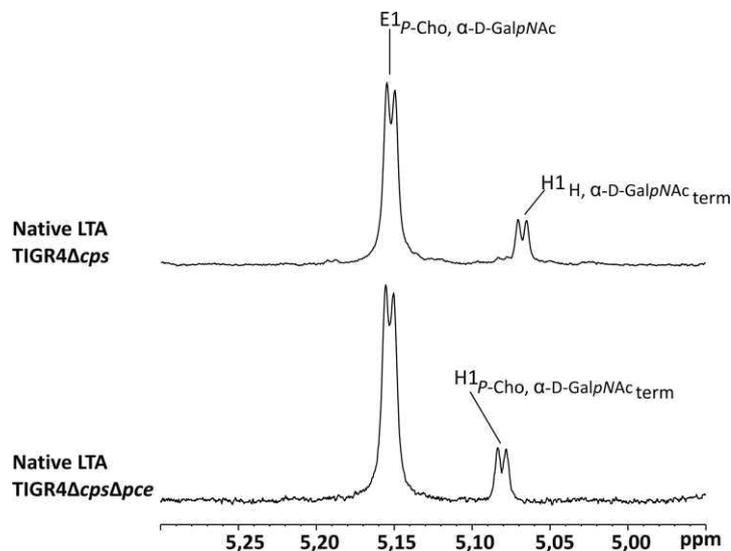
TIGR4ΔcpsΔpce	berechnete Massen	gemessene Massen	Massengenauigkeit
[RU]	[Da]	[Da]	[Δppm]
5	6746,34	6746,33	-1,5
6	8044,78	8044,77	-1,2
7	9344,25*	9344,16*	-9,6

Vergleiche mit den publizierten molekularen Massen für die LTA vom TIGR4Δcps (5 RU = 6416,23; 6 RU = 7714,67 Da; 7 RU = 9014,07 Da [34]) zeigten eine Massendifferenz von jeweils -330 Da (siehe **Abbildung 13**). Diese Massendifferenz entspricht zwei P-Cho-Substituenten. Resultierend aus den Erkenntnissen aus den MS-Untersuchungen konnte das Integral für P-Cho<sub>H</sub> im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der LTA aus dem Stamm TIGR4ΔcpsΔpce auf eins gesetzt werden. Bei einem Vergleich der Integrale für die verschiedenen P-Cho-Substituenten von TIGR4Δcps und TIGR4ΔcpsΔpce zeigte sich, dass bei der LTA aus TIGR4Δcps die P-Cho<sub>H</sub>-Substituenten *in vivo* hydrolysiert wurden (siehe **Tabelle 3**). Des Weiteren zeigte sich bei einer Gegenüberstellung der Integrale für Rib-ol-P<sub>C</sub>/Ribol-P<sub>C</sub> eine etwas andere Kettenlänge (6,05 vs. 6,43). Eine Betrachtung des Verhältnisses von Rib-ol-P<sub>C</sub>/Ribol-P<sub>C</sub> zu den P-Cho-Substituenten am β-D-GalpNAc (P-Cho<sub>D+G</sub>) von beiden *S. pneumoniae* Stämmen macht deutlich, dass eine Hydrolyse am P-Cho<sub>D+G</sub> erfolgt.

Tabelle 3: Integrale aus den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren für Ribitol-Phosphat und die spezifischen Phosphatgruppen der LTA von den Stämmen TIGR4Δ*cps* und TIGR4Δ*cps*Δ*pce* \*Die Integrale für TIGR4Δ*cps* stammen aus [34].

TIGR4	Rib- <i>P</i> <sub>C</sub> /Rib- <i>P</i> <sub>C</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>D+G</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>H</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>E</sub>
Δ <i>cps</i>	6,05*	4,98*	0,20*	5,03*
Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i>	6,43 ± 0,00	6,40 ± 0,21	1,00	5,50 ± 0,12

Bereits diese Untersuchungen verdeutlichten, dass *in vivo* eine Pce induzierte Hydrolyse an den *P*-Cho-Substituenten am β-D-GalpNAc sowie an der terminalen α-D-GalpNAc erfolgt. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnte klar beobachtet werden, dass die Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten an β-D-GalpNAc-Resten nur am terminalen β-D-GalpNAc erfolgt. Dabei führte diese Hydrolyse zu einer Verschiebung des anomeren Protons des terminalen α-D-GalpNAc im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 5,08 ppm zu 5,07 ppm. (siehe **Abbildung 14**, H1).



**Abbildung 14: Hydrolyse des terminalen *P*-Cho-Substituentens am β-D-GalpNAc führt zu Verschiebung des anomeren Protons H1 vom α-D-GalpNAc.** Die Abbildung zeigt den Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (δ<sub>H</sub> 5,30-4,95; D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz) der de-*O*-acylierten pnLTA aus TIGR4Δ*cps* (oberes Spektrum) und der de-*O*-acylierten pnLTA aus TIGR4Δ*cps*Δ*pce* (unteres Spektrum). Die Signale lassen sich für die de-*O*-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4Δ*cps* wie folgt zu ordnen: E1<sub>*P*-Cho, α-D-GalpNAc</sub> δ<sub>H</sub> = 5,15 ppm, H1<sub>*P*-Cho, α-D-GalpNAc,term</sub> δ<sub>H</sub> = 5,07 ppm. Die Signale lassen sich für die de-*O*-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce* wie folgt zu ordnen: E1<sub>*P*-Cho, α-D-GalpNAc</sub> δ<sub>H</sub> = 5,15 ppm; H1<sub>*P*-Cho, α-D-GalpNAc,term</sub> δ<sub>H</sub> = 5,08 ppm.

Die isolierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce* diente in nachfolgenden Betrachtungen für die Untersuchung der spezifischen *P*-Cho-Hydrolyse durch Pce. Dieser Thematik widmet sich das nachfolgende **Kapitel 4.1**.

## 4.1 Spezifische Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten durch die Phosphorylcholine Esterase (Pce)

Zunächst wurden mit isolierter LTA vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* *in vitro*-Versuche mit heterolog exprimierter Pce nach dem Protokoll aus **Kapitel 9.4.6** bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Dafür wurden drei verschiedene Pce-Konzentrationen (80  $\mu$ g Pce/mg LTA, 160  $\mu$ g Pce/mg LTA, 240  $\mu$ g Pce/mg LTA) gewählt. Für die Beurteilung der Hydrolyse-Aktivität der Pce diente das Integral für Rib-ol-*P*<sub>C</sub>/Ribol-*P*<sub>C</sub> ( $6,43 \pm 0,00$ , siehe **Tabelle 3**) von TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* als Referenz für anschließende Betrachtungen. Dabei wurde Rib-ol-*P*<sub>C</sub>/Ribol-*P*<sub>C</sub> als Bezugsgröße gewählt, da diese nicht von der Pce induzierte Hydrolyse betroffen sein wird und somit als Referenz verwendet werden kann.

**Tabelle 4: Integrale aus den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren für Ribitol-Phosphat und die spezifischen Phosphatgruppen der LTA des Stammes TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* sowie für die Pce induzierte Hydrolyse.** Die Pce-Behandlungen erfolgte bei den Konzentrationen von 80, 120 und 160  $\mu$ g Pce/mg LTA und bei einem pH-Wert von 7,4. Für die Integration diente das Ribitol-Phosphat (Rib-*P*<sub>C</sub>/Rib-*P*<sub>C</sub>) von der de-*O*-acylierten LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* als Referenzwert. Dafür erfolgten zwei unabhängige Messungen von der de-*O*-acylierten LTA von TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce*. Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wieder.

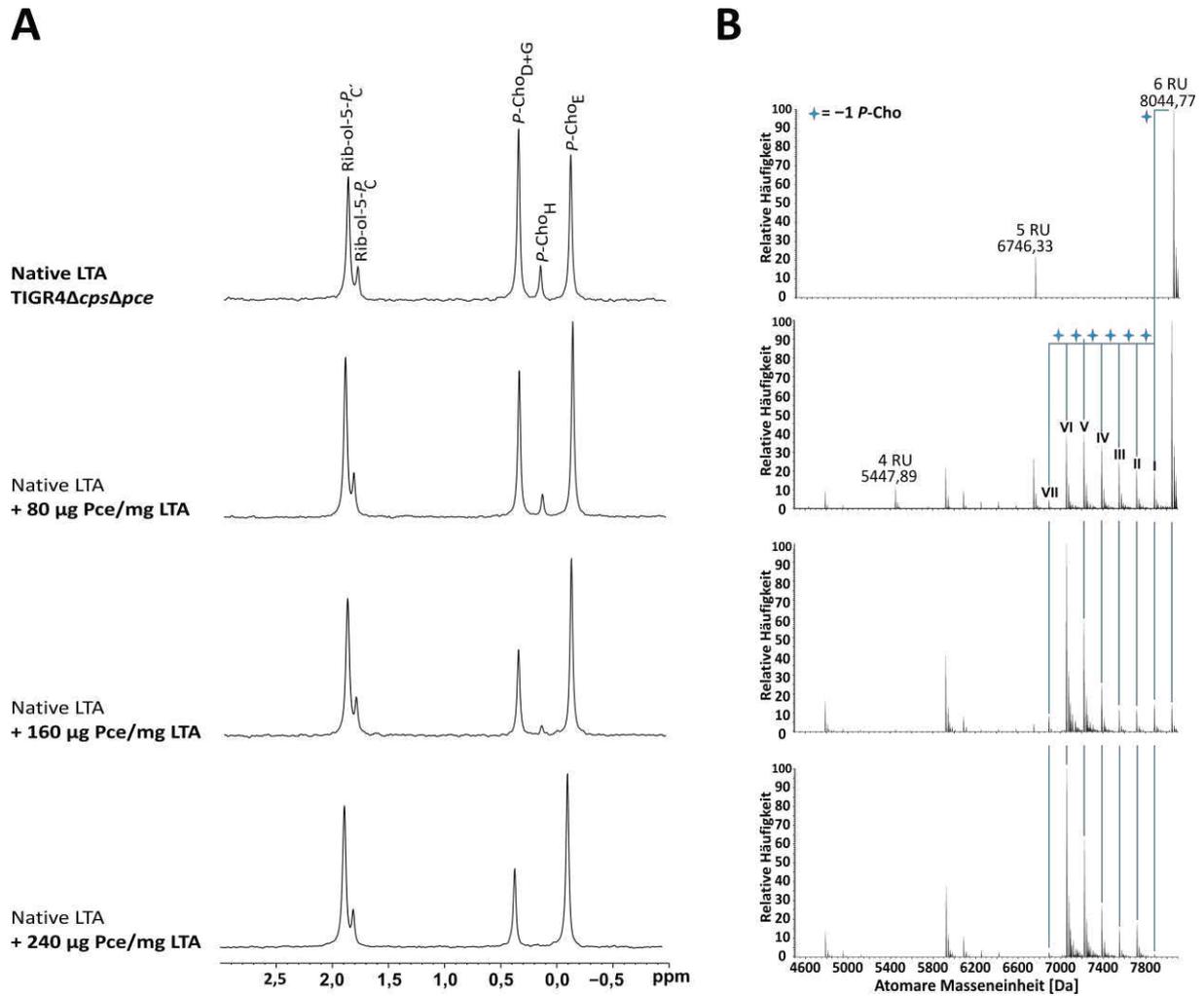
TIGR4	Rib- <i>P</i> <sub>C</sub> / Rib- <i>P</i> <sub>C</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>D+G</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>H</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>E</sub>
<b><i>ΔcpsΔpce</i></b>	$6,43 \pm 0,00$	$6,40 \pm 0,21$	1,00	$5,50 \pm 0,12$
<i>ΔcpsΔpce</i>	6,43	$4,24 \pm 0,11$	$0,49 \pm 0,05$	$5,51 \pm 0,09$
<b>+ 80 <math>\mu</math>g Pce/mg LTA</b>				
<i>ΔcpsΔpce</i>	6,43	$2,61 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,02$	$5,74 \pm 0,08$
<b>+ 160 <math>\mu</math>g Pce/mg LTA</b>				
<i>ΔcpsΔpce</i>	6,43	$2,43 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,04$	$5,48 \pm 0,17$
<b>+ 240 <math>\mu</math>g Pce/mg LTA</b>				

Strukturuntersuchungen mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie und MS zeigten bei der Pce-Behandlung eine Hydrolyse-Abhängigkeit in Verbindung mit den verwendeten Pce-Konzentrationen (80, 160 und 240  $\mu$ g Pce/mg isolierte LTA, siehe **Tabelle 4**). Bereits bei einer Konzentration von 80  $\mu$ g Pce/mg LTA erfolgte im Vergleich mit der de-*O*-acylierten LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* eine Hydrolyse am *P*-Cho<sub>H</sub> sowie am *P*-Cho<sub>D</sub> und *P*-Cho<sub>G</sub>. Dies ließ sich anhand der sehr reduzierten Integrale für *P*-Cho<sub>H</sub> (1,00 vs.  $0,49 \pm 0,05$ ) sowie für *P*-Cho<sub>D+G</sub> ( $6,40 \pm 0,21$  vs.  $4,24 \pm 0,11$ ) erkennen.

Eine Erhöhung der Konzentration auf 160  $\mu\text{g Pce/mg LTA}$  führte zu einer gesteigerten Effektivität der Hydrolyse am  $P\text{-Cho}_{\text{D+G}}$  ( $2,61 \pm 0,03$ ) und  $P\text{-Cho}_{\text{H}}$  ( $0,08 \pm 0,02$ ). Eine erneute Erhöhung der Konzentration auf 240  $\mu\text{g Pce/mg LTA}$  resultiert in keiner weiteren Steigerung der Hydrolyse ( $P\text{-Cho}_{\text{D+G}} = 2,43 \pm 0,04$ ;  $P\text{-Cho}_{\text{H}} = 0,04 \pm 0,04$ ).

Grundsätzlich konnten in den *in vitro* Experimenten mit den verschiedenen Konzentrationen lediglich Hydrolysen am  $P\text{-Cho}_{\text{D+G}}$  sowie am  $P\text{-Cho}_{\text{H}}$  beobachtet werden. Die Integrale für die  $P\text{-Cho}$ -Substituenten am  $\alpha\text{-D-GalpNAc}$  innerhalb der *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit ( $P\text{-Cho}_{\text{E}}$ ) zeigten bei allen drei Konzentrationen keine Veränderungen. Wie zuvor erwähnt, wurden im Massenspektrum der *O*-acylierten LTA von TIGR4 $\Delta\text{cps}\Delta\text{pce}$  monoisotopische Massenpeaks bei 6746,33 Da ( $n = 3$ ), bei 8044,77 Da ( $n = 4$ ) sowie bei 9344,16 Da ( $n = 5$ ) gemessen (siehe **Abbildung 13**). Für den Massenpeak bei 8044,77 Da (LTA mit 6 RUs) ließ sich für die Pce-Behandlung ein schrittweiser Verlust von sieben  $P\text{-Cho}$ -Substituenten ( $7 \times -165$  Da) beobachten, wobei jeweils ein Stern den Verlust von einem  $P\text{-Cho}$  ( $-165$  Da) repräsentiert (siehe **Abbildung 15 B**). Dem Massenpeak VII (siehe **Abbildung 15 B**, entspricht 6889,39 Da) lässt sich ein Verlust von insgesamt sieben  $P\text{-Cho}$ -Substituenten zuordnen. Aufgrund der geringeren Intensität des Signals lässt dies darauf schließen, dass die Effizienz der Hydrolyse an dieser Stelle vermindert ist.

In Kombination mit den Resultaten aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ergab sich, dass die  $P\text{-Cho}_{\text{D}}$ -Substituenten innerhalb der RU *in vitro* ebenfalls hydrolysiert wurden.



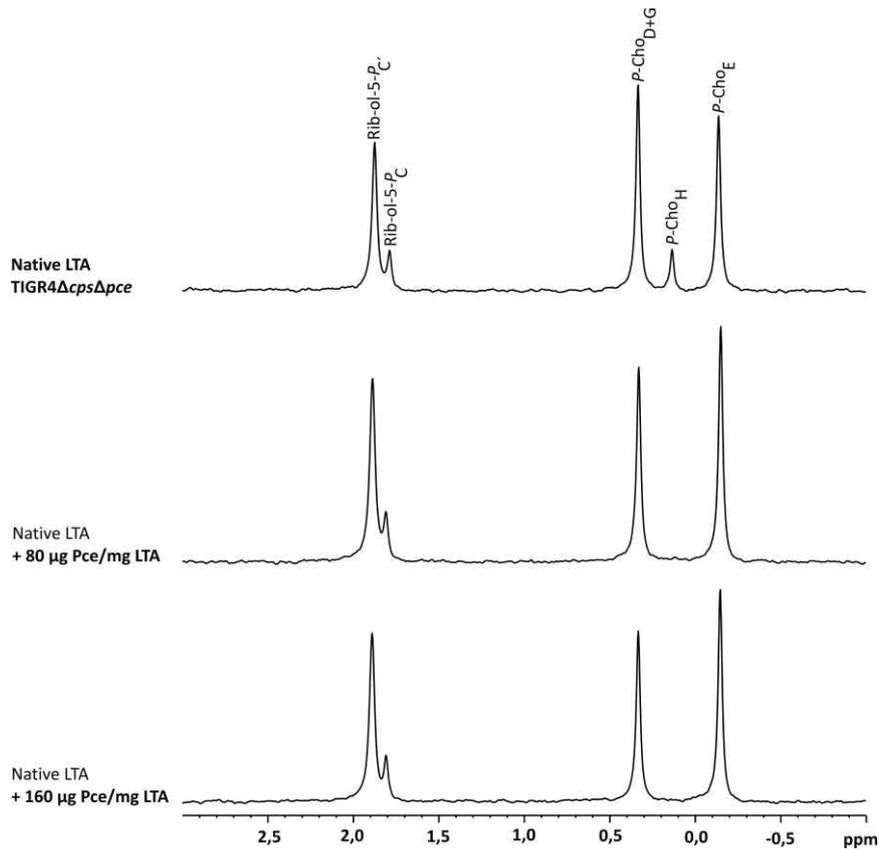
**Abbildung 15:** *In vitro* Pce-Behandlung führt zur Hydrolyse der P-Cho-Substituenten P-Cho<sub>D+G</sub> und P-Cho<sub>H</sub>. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren (A) und Massenspektren (B) für die Pce-Behandlung von isolierter LTA aus dem Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce*. **A)** Ausschnitt von den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren δ<sub>p</sub> 3-(-1) D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz. Dabei entsprechen die Signale folgenden chemischen Verschiebungen: Rib-ol-5-*P*<sub>C</sub> δ<sub>p</sub> = 1,89 ppm; Rib-ol-5-*P*<sub>C</sub> δ<sub>p</sub> = 1,80 ppm; P-Cho<sub>D+G</sub> δ<sub>p</sub> = 0,33 ppm; P-Cho<sub>H</sub> δ<sub>p</sub> = 0,13 ppm; P-Cho<sub>E</sub> δ<sub>p</sub> = -0,15 ppm. **B)** Bei den Massenspektren ist ein Bereich von 4500-8000 Da gezeigt. Jeder Stern mit der dazugehörigen blauen Linie repräsentiert die Hydrolyse von einem P-Cho-Substituenten und dementsprechend einem Massenverlust von -165 Da. Die dazugehörigen berechneten Massen sind in **Tabelle 5** aufgelistet. Die Pce-Behandlung erfolgte in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei einem pH-Wert von 7.4 für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C.

Ein Vergleich der resultierenden Massen für die verschiedenen Kettenlängen mit den berechneten Massen ergab eine sehr hohe Genauigkeit (siehe **Tabelle 5**).

Tabelle 5: Monoisotopenpeaks für die Pce induzierte Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten. Beispielhaft gezeigt für 6 RU und einer Pce-Behandlung bei einer Konzentration von 80 µg Pce/mg LTA.

LTA 6 RU		Monoisotopenpeak		
Fehlende <i>P</i> -Cho		Berechnete Massen [Da]	Gemessene Massen [Da]	Massengenauigkeit [Δppm]
	0 <i>P</i> -Cho	8044,78	8044,77	-2,0
I	1 <i>P</i> -Cho	7879,73	7879,72	-1,5
II	2 <i>P</i> -Cho	7714,67	7714,66	-1,7
III	3 <i>P</i> -Cho	7549,62	7549,61	-1,3
IV	4 <i>P</i> -Cho	7384,56	7384,55	-1,1
V	5 <i>P</i> -Cho	7219,51	7219,50	-1,1
VI	6 <i>P</i> -Cho	7054,45	7054,44	-1,0
VII	7 <i>P</i> -Cho	6889,40	6889,39	-0,3

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob eine veränderte Effektivität der *in vitro* *P*-Cho-Hydrolyse bei einem pH-Wert von 8,0 vorliegt. Für die Untersuchungen mit dem pH-Wert von 8,0 war das Vorgehen für die Pce-Behandlung sowie für die <sup>31</sup>P-NMR und MS-Analyse dasselbe wie bei dem pH-Wert von 7,4. Eine Änderung des pH-Wertes in den leicht basischen Bereich (pH-Wert 8,0) zeigte bereits bei 80 µg Pce/mg LTA einen Effekt im Hinblick auf die *P*-Cho<sub>H</sub>-Hydrolyse. Während sich bei dieser Konzentration bei einem pH-Wert von 7,4 noch ein *P*-Cho<sub>H</sub>-Gehalt von 0,49 ± 0,05 nachweisen ließ, war dieser *P*-Cho-Substituent bei einem pH-Wert von 8,0 vollständig hydrolysiert (0,01 ± 0,01). Jedoch erfolgte eine geringe Hydrolyse der *P*-Cho<sub>D+G</sub>-Substituenten am β-D-GalpNAc. Eine Erhöhung der Konzentration von 80 µg Pce/mg LTA auf 160 µg Pce/mg LTA führte, im Vergleich zum pH-Wert von 7,4, zu keiner gesteigerten Hydrolyse (siehe **Abbildung 16** und **Tabelle 6**).



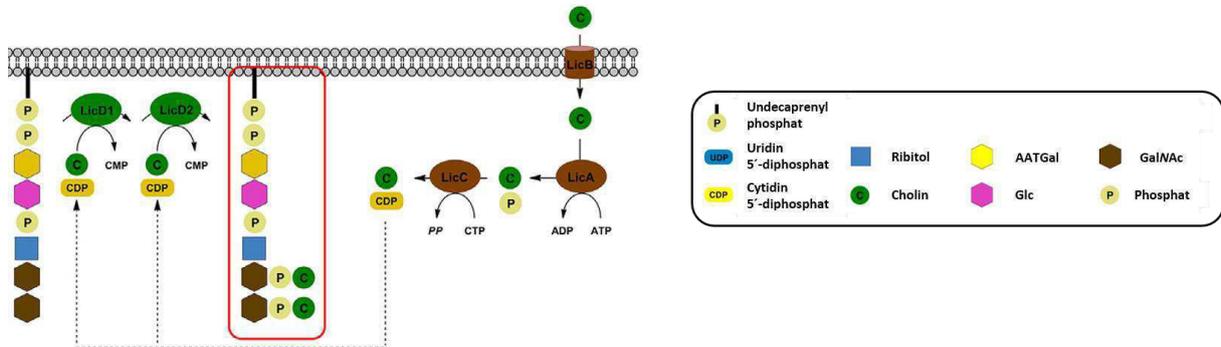
**Abbildung 16:** Die *in vitro* Pce-Behandlung bei einem pH-Wert von 8,0 führt zu einer effektiveren Hydrolyse des *P-Cho<sub>H</sub>*-Substituenten. Ausschnitt von den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren  $\delta_P$  3-(−1) D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz. Die Signale lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol-5-*P<sub>C</sub>*  $\delta_P$  = 1,89 ppm; Rib-ol-5-*P<sub>C</sub>*  $\delta_P$  = 1,80 ppm; *P-Cho<sub>D+G</sub>*  $\delta_P$  = 0,33 ppm; *P-Cho<sub>H</sub>*  $\delta_P$  = 0,13 ppm; *P-Cho<sub>E</sub>*  $\delta_P$  = −0,15 ppm. Die Pce-Behandlung erfolgte in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei einem pH-Wert von 8,0 für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C. An dieser Stelle wurden zwei Pce Konzentrationen (80 µg Pce/mg LTA; 160 µg Pce/mg LTA) analysiert.

**Tabelle 6:** Integrale für Ribitol-Phosphat und für die spezifischen Phosphatgruppen der LTA des Stammes TIGR4ΔcpsΔpce sowie für die Pce induzierte Hydrolyse. Die Pce-Behandlung erfolgte bei den Konzentrationen von 80 und 160 µg Pce/mg LTA für 24 h bei 37 °C in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0). Für die Integration der verschiedenen Phosphat-Signale diente das Ribitol-Phosphat (Rib-*P<sub>C</sub>*/Rib-*P<sub>C</sub>*) von der de-*O*-acylierten LTA vom TIGR4ΔcpsΔpce als Referenzwert. Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wider. n.b. = nicht bestimmbar

TIGR4	Rib- <i>P<sub>C</sub></i> / Rib- <i>P<sub>C</sub></i>	<i>P-Cho<sub>D+G</sub></i>	<i>P-Cho<sub>H</sub></i>	<i>P-Cho<sub>E</sub></i>
<b>ΔcpsΔpce</b>	6,43 ± 0,00	6,40 ± 0,21	1,00	5,50 ± 0,12
ΔcpsΔpce	6,43	4,67 ± 0,04	0,01 ± 0,01	5,59 ± 0,01
<b>+ 80 µg Pce/mg LTA</b>				
ΔcpsΔpce	6,43	4,39 ± 0,08	n.b.	5,69 ± 0,03
<b>+ 160 µg Pce/mg LTA</b>				

Zusammenfassend zeigten die *in vitro*-Versuche eine spezifische Hydrolyse der verschiedenen *P*-Cho-Substituenten. Diese konnte in allen Untersuchungen ausschließlich an den *P*-Cho-Substituenten der terminalen  $\alpha$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>H</sub>) sowie am  $\beta$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>D+G</sub>) beobachtet werden. Weiterhin zeigten die Pce-Behandlungen bei zwei verschiedenen pH-Werten keine Änderungen in der Spezifität. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnte lediglich eine effektivere Hydrolyse des Terminus bei einer geringeren Pce-Konzentration beobachtet werden. An den *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>E</sub>) innerhalb der RU erfolgte unabhängig von der Pce-Konzentration und dem pH-Wert keine Hydrolyse. Diese Ergebnisse spiegeln die in der Literatur diskutierten Begrenzungen der Pce-Aktivität sehr gut wider. W. Vollmer und A. Tomasz stellten die Hypothese auf, dass die Aktivität der Pce aufgrund der Oberflächen-Topographie der Pneumokokken-Zellwand begrenzt sei [69]. Weiterhin stützt das beobachtete Hydrolyse-Verhalten in der vorliegenden Arbeit die Thesen von Behr et al. [37] und Fischer et al. [38]. In beiden Studien wurde diskutiert, dass die Pce nicht zu einer vollständigen Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten führt, sondern spezifisch ein *P*-Cho-Substituent pro RU hydrolysiert wird. Mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie konnte nun gezeigt werden, dass unabhängig von der Pce-Konzentration und von dem pH-Wert, die Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten nur am  $\beta$ -D-GalpNAc erfolgt. Eine Ausnahme stellt hier der Terminus dar, an dem die Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten sowohl am  $\alpha$ - als auch am  $\beta$ -D-GalpNAc erfolgt. W. Vollmer und A. Tomasz stellten die Hypothese auf, dass die Pce lediglich die terminalen *P*-Cho-Substituenten (*P*-Cho<sub>H</sub>, *P*-Cho<sub>G</sub>) der TA hydrolysiert [69]. Diese These kann für *in vivo* Bedingungen anhand der isolierten LTA vom TIGR4 bestätigt werden. Unter *in vitro* Bedingungen jedoch erfolgt, zusätzlich zur Hydrolyse am Terminus, die Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten innerhalb der Kette. Anhand einer Kristallstruktur von Pce konnten J. A. Hermoso et al. zeigen, dass diese aus zwei unterschiedlichen Modulen zusammengesetzt ist [26]. Die Struktur der Pce besteht dabei aus einer katalytischen Domäne und aus einer Cholin-Bindedomäne. Die katalytische Domäne ist am N-terminalen Ende des Proteins lokalisiert und beinhaltet 312 Aminosäuren. Die Cholin-Bindedomäne ist am C-terminalen Ende angeordnet und besteht aus 205 Aminosäuren. Beide Domänen werden durch eine kleine verknüpfende Einheit miteinander verbunden. Der Kristallstruktur von J. A. Hermoso et al. waren eine klare Anordnung der einzelnen Einheiten sowie unterschiedliche Größen als auch Formen der einzelnen Domänen zu entnehmen. Aufgrund der unterschiedlichen Domänen sowie deren Größe und Formen könnte dies die unterschiedliche Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten bedingen. Die starre Anordnung der Domänen könnte dazu führen, dass lediglich die *P*-Cho-Substituenten am  $\beta$ -D-GalpNAc-Substituenten für die katalytische Domäne zugänglich sind.

Bioinformatische Untersuchungen sowie verschiedene Studien zeigten, dass die Anheftung der *P*-Cho-Substituenten durch LicD1 und LicD2 erfolgt (siehe **Abbildung 17 und Kapitel 1.3**). Dabei soll die Übertragung mittels LicD1 essenziell und die Übertragung mittels LicD2 nicht essenziell für das Bakterium sein.



**Abbildung 17: Aufnahme und Metabolismus von Cholin sowie die Anheftung der Phosphorylcholine (*P*-Cho) an *D*-Gal $\beta$ NAc durch LicD1 und LicD2.** *S. pneumoniae* ist auf die Anwesenheit von exogenem Cholin angewiesen, das es mittels LicB aufnimmt und mit Hilfe von LicA und LicC metabolisiert. Im Anschluss wird CTP-aktiviertes Phosphorylcholine durch die Enzyme LicD1 und LicD2 auf  $\alpha$ -/ $\beta$ -*D*-Gal $\beta$ NAc übertragen. Bild modifiziert von [39].

Aus der Literatur sind Stämme mit jeweils einem *P*-Cho-Substituenten pro RU bekannt [33, 38, 72]. Für die LTA ist nur ein Stamm mit jeweils einem *P*-Cho pro RU bekannt, dabei handelt es sich um Rx1 [72, 73]. Bei der WTA sind zahlreiche Serotypen bzw. Stämme mit nur einem *P*-Cho pro RU bekannt; dazu zählen unter anderem Serotyp 1 [74], der Stamm R6 [72, 73], Serotyp 9A [74] sowie der Serotyp 18B [75]. In den Serotypen 1, 9A und 18B liegen, unabhängig vom Stamm, nur die *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -*D*-Gal $\beta$ NAc vor.

Die Annahmen, dass eine spezifische Anheftung der *P*-Cho-Substituenten durch LicD1 und LicD2 erfolgt, müssen auf struktureller Ebene noch belegt werden. Der struktur-chemische Beweis sollte daher im nächsten Schritt unter Verwendung einer LicD2-Deletion erbracht werden und wird in dem **Kapitel 4.2** ausführlich beschrieben.

## 4.2 LicD2 katalysiert die spezifische *P*-Cho-Anheftung am $\beta$ -D-GalpNAc

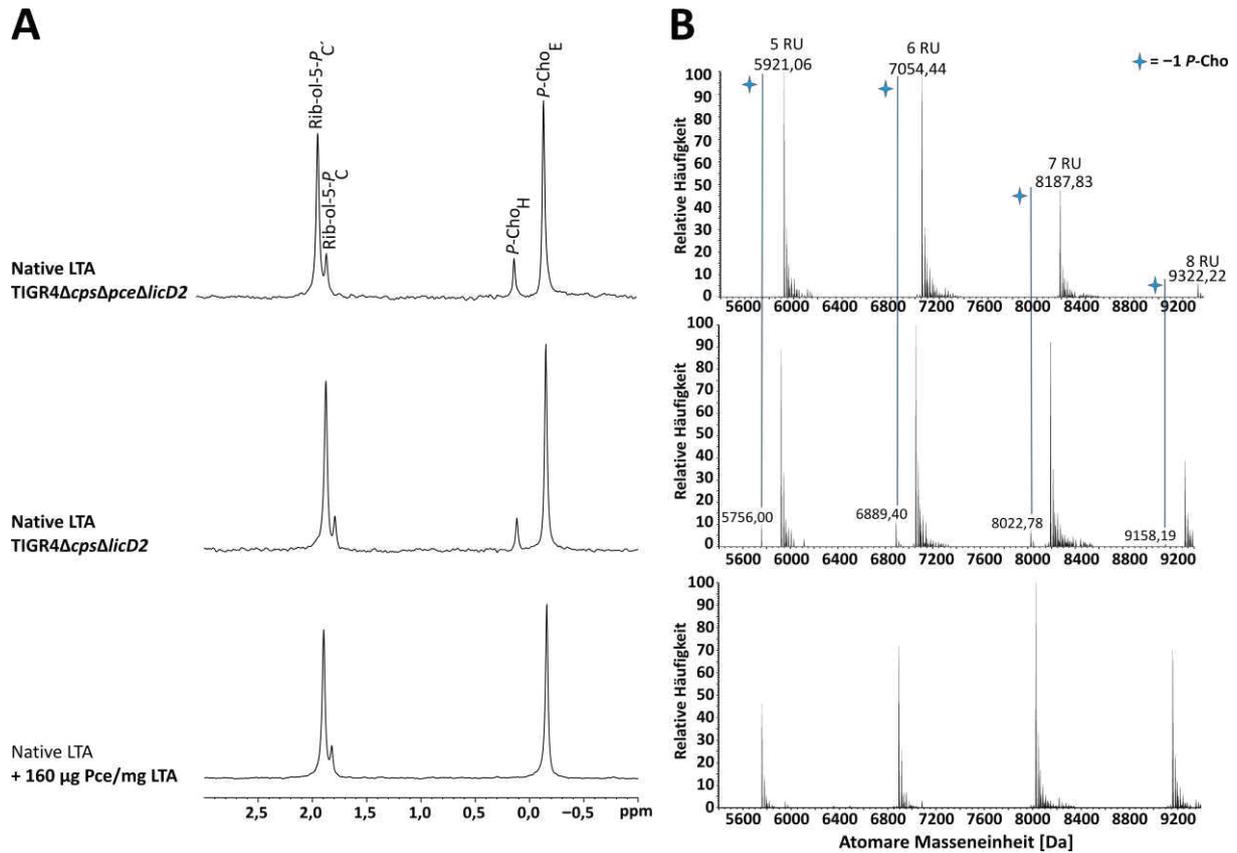
Für die Untersuchungen der spezifischen *P*-Cho-Anheftung wurde die LTA aus den LicD2-Deletionsstämmen TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* und TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* (von Dr. Thomas Kohler<sup>5</sup> generiert) nach den Protokollen in **Kapitel 9.4.2** und **Kapitel 9.4.3** extrahiert sowie isoliert.

Im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der de-*O*-acylierten LTA vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* ließen sich lediglich die Signale für die *P*-Cho<sub>E</sub> ( $\delta_{P\text{-Cho}_E} = -0,16$  ppm) sowie das Signal für *P*-Cho<sub>H</sub> ( $\delta_{P\text{-Cho}_H} = 0,11$  ppm) nachweisen (siehe **Abbildung 18 A**, mittleres Spektrum). Der *P*-Cho-Substituent am  $\beta$ -D-GalpNAc vom Terminus sowie innerhalb der RU ( $\delta_{P\text{-Cho}_{D+G}} = 0,33$  ppm), konnte nicht im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum beobachtet werden (siehe **Abbildung 18 A**). Dieser Sachverhalt gilt gleichermaßen für den *Pce*-LicD2-Deletionsstamm im unbekapselten Hintergrund (siehe **Abbildung 18 A**, oberes Spektrum). Die vollständigen NMR-Datensätze für die LTA vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* sowie für die LTA vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* sind in den **Kapitel 10.2** und **10.3** enthalten. Auch hier wurde bei der Integration der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren der Ribitol-Phosphat-Wert vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* als Referenzwert herangezogen. Bei einem Vergleich der Integrale für *P*-Cho<sub>H</sub> vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* (1,00) mit TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* ( $0,76 \pm 0,05$ ; siehe **Tabelle 7**) zeigte sich, dass trotz fehlender *P*-Cho-Substitution am  $\beta$ -D-GalpNAc eine Hydrolyse am *P*-Cho<sub>H</sub> erfolgte. Diese konnte durch eine zusätzliche *Pce*-Deletion (TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2*) ausgeschlossen werden, womit eine LTA mit jeweils einen *P*-Cho-Substituten pro RU vorlag (siehe **Abbildung 18 A, B**).

**Tabelle 7: Integrale für die spezifischen Phosphatgruppen-Signale im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der LTA aus dem *Pce*-Deletionsstamm, den LicD2-Deletionsstämmen sowie für die *Pce*-Behandlung.** Die *Pce*-Behandlung erfolgte bei einer Konzentration von 160  $\mu$ g *Pce*/ mg LTA bei einem pH-Wert von 7,4. Für die Integration der Phosphat-Signale diente das Ribitol-Phosphat (Rib-*P<sub>C</sub>*/Rib-*P<sub>C</sub>*) von der de-*O*-acylierten LTA vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* als Referenzwert. Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wider. n.b. = nicht bestimmbar

TIGR4	Rib- <i>P<sub>C</sub></i> / Rib- <i>P<sub>C</sub></i>	<i>P</i> -Cho <sub>D+G</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>H</sub>	<i>P</i> -Cho <sub>E</sub>
<b><i>ΔcpsΔpce</i></b>	6,43 ± 0,00	6,40 ± 0,21	1,00	5,50 ± 0,12
<b><i>ΔcpsΔlicD2</i></b>	6,43	n.b.	0,76 ± 0,05	5,60 ± 0,23
<i>ΔcpsΔlicD2</i>	6,43	n.b.	n.b.	5,70 ± 0,08
<b>+ 160 <math>\mu</math>g <i>Pce</i>/mg LTA</b>				
<b><i>ΔcpsΔpceΔlicD2</i></b>	6,43	n.b.	1,00 ± 0,01	5,44 ± 0,04

<sup>5</sup> Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland



**Abbildung 18: Strukturbeweis für die spezifische P-Cho-Anheftung am  $\beta$ -D-GalpNAc katalysiert durch LicD2 sowie Untersuchungen für eine anschließende Pce induzierte Hydrolyse.** Die Abbildung zeigt das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (**A**), die dazugehörigen Massenspektren (**B**) von *S. pneumoniae* TIGR4ΔcpsΔpceΔlicD2 (obere Spektren), TIGR4ΔcpsΔlicD2 (mittlere Spektren) und TIGR4ΔcpsΔlicD2 mit 160 μg Pce /mg isolierte LTA Pce-Behandlung (untere Spektren). (**A**) Zeigt einen Ausschnitt ( $\delta_P$  (3-(-1) ppm) aus den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz). Die Signale lassen sie wie folgt zuordnen: Rib-ol-5- $P_C$   $\delta_P$  =1,88 ppm; Rib-ol-5- $P_C$   $\delta_P$  = 1,79 ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (Terminus; P-Cho<sub>H</sub>)  $\delta_{P\text{-ChoH}}$  = 0,11 ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (RU; P-Cho<sub>D</sub>)  $\delta_{P\text{-ChoE}}$  = -0,16 ppm. (**B**) Ausschnitt aus den Massenspektren von 5400-9300 Da. Die Signale lassen sich wie folgt zu ordnen: 5921,06 Da entsprechen 5 RU; 7054,44 Da entsprechen 6 RU; 8187,83 Da entsprechen 7 RU; 9322,22 Da entsprechen 8 RU. (n = 2).

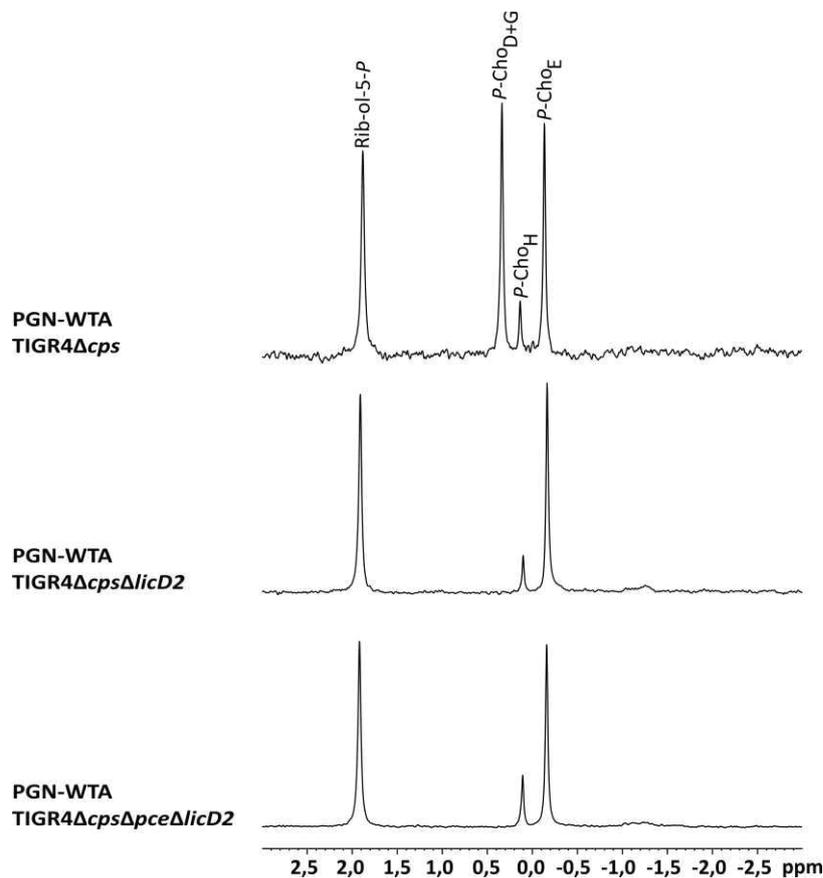
In massenspektrometrischen Untersuchungen der de-O-acylierten LTA aus TIGR4ΔcpsΔpceΔlicD2 konnten nur TA mit einem P-Cho pro RU beobachtet werden (siehe **Tabelle 8**). Die gemessene molekulare Masse für 6 RU war 7054,44 Da und entsprach hiermit der zuvor berechneten molekularen Masse von 7054,45 Da. Für die LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4ΔcpsΔlicD2 konnten zusätzliche Signale mit einer Massendifferenz von -165 Da beobachtet werden (siehe **Abbildung 18 B**). Diese Differenz entspricht dem Massenverlust von einem P-Cho und resultiert aus der Hydrolyse des zuvor erwähnten P-Cho<sub>H</sub>.

Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen für die de-O-acylierten LTA aus den *S. pneumoniae* Stämmen TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* und TIGR4Δ*cps*Δ*licD2*, inklusive für die Pce-Behandlung von TIGR4Δ*cps*Δ*licD2*. \*Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak bzw. \*\* dm dritten Isotopenpeak.

LTA-Spezies		Monoisotopenmassen		
Stamm	RU	Berechnete Massen [Da]	Gemessene Massen [Da]	Massengenauigkeit [Δppm]
TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> Δ <i>licD2</i>	4	4787,67	4787,67	0
	5	5921,06	5921,06	0
	6	7054,45	7054,44	-1,4
	7	8187,84	8187,83	-1,2
	8	9322,24*	9322,22*	-2,1
TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>licD2</i>	4	4787,67	4787,66	-2,1
	-1 P-Cho	4622,62	4622,61	-2,2
	5	5921,06	5921,06	0
	-1 P-Cho	5756,00	5756,00	0
	6	7054,45	7054,45	0
	-1 P-Cho	6889,40	6889,40	0
	7	8187,84	8187,83	-1,2
	-1 P-Cho	8022,79	8022,78	-1,2
	8	9321,23	9321,22	-1,1
-1 P-Cho	9158,18**	9158,19**	-1,1	
+ 160 μg Pce/mg LTA	4	4622,62	4622,61	-2,2
	5	5756,00	5756,00	0
	6	6889,40	6889,39	-1,5
	7	8022,79	8022,78	-1,2
	8	9156,18	9156,16	-2,2
	9	10289,57	10289,63	5,8

Die Pce-Behandlung bei einer Konzentration von 160 μg Pce/mg LTA vom TIGR4Δ*cps*Δ*licD2* führte in diesem Fall lediglich zur vollständigen Hydrolyse des terminalen P-Cho<sub>H</sub> (siehe **Abbildung 18 A** und **B**). Auch hier zeigte sich keine Hydrolyse der P-Cho<sub>E</sub>-Substituenten innerhalb der RU. Bioinformatische Studien weisen auf einen gemeinsamen Vorläufer der pNTA für LTA und WTA hin (siehe **Kapitel 1.3**) [39]. Aufgrund dieser Annahme wurde vermutet, dass die WTA aus den Stämmen TIGR4Δ*cps*Δ*licD2* und TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* ebenfalls nur P-Cho-Substituenten an den α-D-GalpNAc aufweisen würde.

Diese Hypothese wurde durch Analysen des PGN-WTA-Komplexes mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR bestätigt. Bei einem Vergleich der Spektren von dem PGN-WTA-Komplex aus den Stämmen TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* und TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* mit dem Wildtyp-Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* ließ sich dasselbe Substitutionsmuster wie bei der LTA beobachten (siehe **Abbildung 19**). Auch hier liegt der PGN-WTA-Komplex mit nur einem *P*-Cho-Substituenten, jeweils am  $\alpha$ -D-GalpNAc gebunden, pro RU vor. Die *P*-Cho-Substituenten an den  $\beta$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>D+G</sub>) ließen sich auch in diesem Fall nicht nachweisen.



**Abbildung 19: Strukturbeweis für die spezifische *P*-Cho-Anheftung am  $\beta$ -D-GalpNAc katalysiert durch LicD2 für den PGN-WTA-Komplex.**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_P$  3(-)3;  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) des PGN-WTA-Komplexes aus den Stämmen TIGR4 $\Delta$ *cps* (oberes Spektrum), TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *licD2* (mittleres Spektrum) und vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* (unteres Spektrum). Die Signale können wie folgt zugeordnet werden: Rib-ol-5-*P*  $\delta_P = 1,92$  ppm;  $\beta$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>D+G</sub>)  $\delta_{P\text{-ChoD+G}} = 0,33$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>H</sub>)  $\delta_{P\text{-ChoH}} = 0,11$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (*P*-Cho<sub>E</sub>)  $\delta_{P\text{-ChoE}} = -0,16$  ppm.

Es konnte der strukturelle Beweis erbracht werden, dass die Anheftung der *P*-Cho-Substituenten durch LicD1 und LicD2 erfolgt. Mit Hilfe von NMR und MS konnte gezeigt werden, dass LicD2 für die Anheftung von *P*-Cho-Substituenten an das  $\beta$ -D-GalpNAc verantwortlich ist. Zusätzlich zu dem strukturellen Beweis der *P*-Cho Anheftung am  $\beta$ -D-GalpNAc mittels LicD2 konnte mit der *P*-Cho-Hydrolyse des Terminus durch die Pce gezeigt werden, dass für die Bindung der Pce lediglich die *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc notwendig sind. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die unterschiedliche Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten, welche durch die Konformation und Anordnung der verschiedenen Domänen der Pce bedingt wird (vgl. **Kapitel 4.1**).

Zusätzlich lässt dies den Schluss zu, dass die *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc für die kovalente Bindung mit der Cholin-Bindedomäne der CBPs notwendig sind. Mit einer zusätzlichen *Pce*-Deletion konnte die *in vivo*-Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten des Terminus unterbunden werden. Damit ist ein Deletionsstamm vorhanden, der exakt einen *P*-Cho-Substituenten pro *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit aufweist. Aus der Literatur sind verschiedene Stämme bekannt, die jeweils nur einen *P*-Cho-Substituenten pro RU aufweisen, wobei auch bei diesen Stämmen jeweils die *P*-Cho-Substituenten am  $\beta$ -D-GalpNAc nicht vorliegen [33, 72, 73]. Zusätzliche Untersuchungen des PGN-WTA-Komplexes lieferten struktur-chemisch dieselben Ergebnisse, was die Annahme eines gemeinsamen Biosyntheseweges sowie eines gemeinsamen Vorläufers nochmals stärkt. Weiterhin lässt dies darauf schließen, dass die Teichoic Acid Flippase (TafF), verantwortlich für den Transport des Vorläufers durch die Zytoplasmamembran (siehe **Kapitel 1.3**), auch Vorläufer mit nur einem *P*-Cho pro *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit transportiert. M. Damjanovic et al. konnten in verschiedenen Untersuchungen zeigen, dass die Abwesenheit von Cholin für das Bakterium letal ist. Ein Aminosäuren-Austausch im TafF führt hingegen zum Transport des TA-Vorläufers trotz fehlender *P*-Cho-Substitution am  $\alpha$ - und am  $\beta$ -D-GalpNAc durch die Zytoplasmamembran [47]. Die *P*-Cho-Substituenten der TAs dienen als Anker für CBPs. Anhand von spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche CBPs könnte in Zukunft in weiteren Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie der Einfluss von *Pce*- und *LicD2*-Deletion auf die CBPs auf der Zelloberfläche ermittelt werden. Eine *Pce*-induzierte Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten führt zu einer verminderten Erkennung durch den Wirt, z.B. durch das C-reaktive Protein (CRP). Dabei führt die Bindung des CRPs an die *P*-Cho-Substituenten zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung von humoralen als auch zellulären Effektormechanismen des adaptiven und angeborenen Immunsystems [68]. Diese Aktivierung wird durch die *Pce*-induzierte Hydrolyse unterbunden, wodurch Pneumokokken länger vom Immunsystem unerkant bleiben [68]. Perspektivisch könnte in einem Tierversuch der Einfluss der *P*-Cho-Substituenten auf die Virulenz untersucht werden.

Wie bereits erläutert, ist *S. pneumoniae* auf exogenes Cholin angewiesen (siehe **Kapitel 1.3**). Durch Genom-Modifizierung konnte in den letzten Jahrzehnten verschiedene Cholin-unabhängige Pneumokokken-Stämme generiert werden [47, 56, 72, 76]. Die Cholin-unabhängigen Stämme (D39Cho<sup>-</sup>, D39Cho<sup>-</sup>licA64) wurden von Alexander Tomasz<sup>6</sup> zur Verfügung gestellt und im Labor von PD Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding<sup>7</sup> kultiviert. In dem Stamm D39Cho<sup>-</sup> erfolgte der Austausch des *licD3*-Genlokus von *S. pneumoniae* gegen den *licD3*-Genlokus von *S. oralis*. Eine weitere Deletion des Proteins LicA, das für die Aktivierung des exogenen aufgenommenen Cholins verantwortlich ist (siehe

---

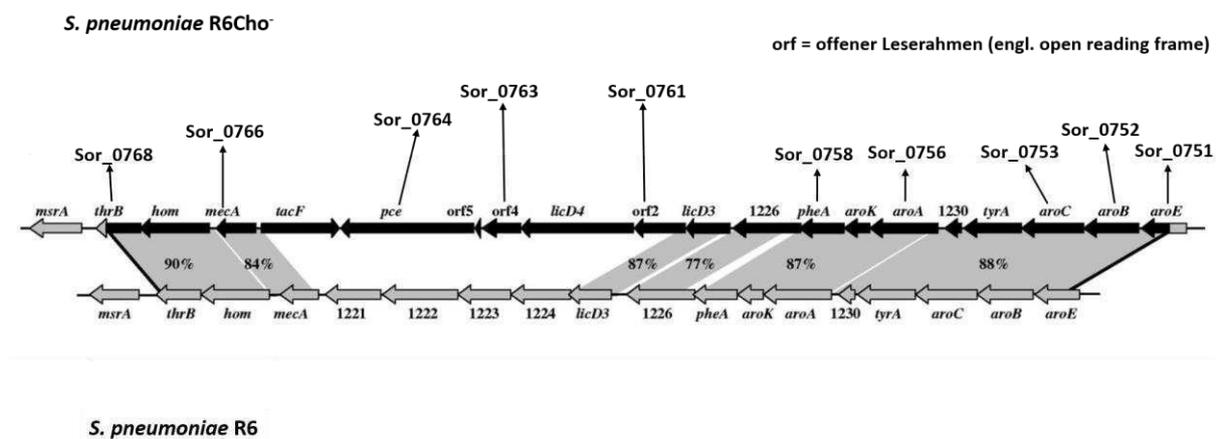
<sup>6</sup> Labor für Mikrobiologie, Rockefeller Universität, New York, USA

<sup>7</sup> Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland

**Kapitel 1.3**), führte zu dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64. Sowohl der Einbau des *S. oralis* ATCC 35037 *licD3*-Genlokus als auch die zusätzliche LicA-Deletion führen wahrscheinlich zu einer LTA-Struktur, die sowohl Elemente von der LTA von *S. pneumoniae* als auch von *S. oralis* aufweist. Dieser Sachverhalt wurde bis jetzt jedoch noch nicht auf struktureller Ebene überprüft. Mit Hilfe von NMR- und MS-Analysen wurde diese Frage untersucht, wie in **Kapitel 5** eingehend erläutert wird.

## 5. Strukturuntersuchung der LTA aus zwei Cholin-unabhängigen *S. pneumoniae* Stämmen

Der Austausch des *licD3*-Genlokus von dem *S. pneumoniae* Stamm R6 gegen den *licD3*-Genlokus von *S. oralis* ATCC 35037 resultiert in Cholin-unabhängigen *S. pneumoniae* Stämmen. Ein Vergleich des *licD3*-Genlokus in dem resultierenden *S. pneumoniae* Stamm R6Cho<sup>-</sup> mit dem des *S. pneumoniae* R6 Wildtyp-Stammes (siehe **Abbildung 20**) ermöglicht Rückschlüsse auf die zu erwartende LTA-Struktur. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass auch *S. oralis* Cholin in seine Zellwand integriert (siehe LTA in **Abbildung 7 B** [55]), jedoch im Vergleich zu *S. pneumoniae* nicht auf die Anwesenheit von exogenem Cholin angewiesen ist [59].



**Abbildung 20:** Vergleich des *licD3*-Genlokus in *S. pneumoniae* R6Cho<sup>-</sup> (oberer Bereich) mit dem des *S. pneumoniae* R6 Wildtyp-Stammes (unterer Bereich). Die *S. pneumoniae* R6 Gene sind mit grauen Pfeilen und die aus dem *S. oralis* stammenden Gene mit schwarzen Pfeilen sowie der Abkürzung Sor gekennzeichnet. Verändert nach [77].

Tabelle 9: Zuordnung der Gene aus der Abbildung 20 aus dem *licD3*-Genlokus aus dem *S. pneumoniae* Stamm R6Cho<sup>-</sup>, den zugehörigen Proteinen sowie deren entsprechende Funktionen in der LTA-Biosynthese des *S. oralis* aus dem Stamm Uo5.

Gen	Protein	Funktion
<i>aroE</i>	Sor_0751	Shikimat-5-Dehydrogenase
<i>aroB</i>	Sor_0752	3-Dehydroquinat-Synthase
<i>aroC</i>	Sor_0753	Chorismat-Synthase
<i>tyrA</i>	Sor_0754	Phrephenat-Dehydrogenase
	Sor_0755	Hypothetisches Protein
<i>aroA</i>	Sor_0756	3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase
<i>aroK</i>	Sor_0757	Shikimat-Kinase
<i>pheA</i>	Sor_0758	Prephenat-Dehydrogenase
	Sor_0759	Transkriptionaler Regulator
<i>LicD3</i>	Sor_0760	93% Identität mit LicD3 (Spr1225) von Pneumokokken (siehe <b>Kapitel 1.3</b> )
<i>orf2</i>	Sor_0761	Glykosyltransferase; 42% Ähnlichkeit zu Spr1223 (siehe <b>Kapitel 1.3</b> )
<i>LicD4</i>	Sor_0762	Phosphortransferase
<i>orf4</i>	Sor_0763	Zusätzliches Protein mit einer limitierten Homologie zu der LicD-Domäne
<i>pce</i> [78]	Sor_0764	Teichonsäure Phosphorylcholin Esterase (Pce)
<i>tacF</i>	Sor_0765	Teichonsäure Flippase
<i>mecA</i>	Sor_0766	Adapterprotein
<i>hom</i>	Sor_0767	Homoserin-Dehydrogenase
<i>thrB</i>	Sor_0768	Homoserin-Kinase
<i>msrA</i>	Sor_0769	Bifunktionale Methionin-Sulfoxid-Reduktase

Im *S. pneumoniae* Stamm R6 sind zwei Glykosyltransferasen (Spr\_1223 und Spr\_1224) vorhanden, welche die Übertragung und Anheftung von jeweils einem GalNAc-Substituenten in der TA-Biosynthese katalysieren (siehe **Kapitel 1.3**). Im R6Cho<sup>-</sup> Stamm konnte hingegen nur die Glykosyltransferase Sor\_0761 nachgewiesen werden, was ein starkes Indiz für die Anwesenheit nur eines GalNAc-Substituenten pro RU in der LTA dieses Stammes darstellt. Dabei weist die Aminosäuresequenz von Sor\_0761 eine 42%ige Ähnlichkeit zu Spr\_1223 auf [55], welches in *S. pneumoniae* für die Anheftung des  $\beta$ -D-GalNAcs verantwortlich ist (siehe **Kapitel 1.3**). Das Vorhandensein von  $\beta$ -D-GalNAc sowohl in der LTA von *S. pneumoniae* als auch von *S. oralis*, führt zu der Hypothese, dass die Anheftung von  $\beta$ -D-GalNAc in *S. oralis* durch Sor\_0761 vermittelt wird. Weiterhin konnten sowohl in *S. oralis* als auch im *licD3*-Genlokus von R6Cho<sup>-</sup> kein Homolog zu Spr\_1224 identifiziert werden, welches in *S. pneumoniae* für die Anheftung von  $\alpha$ -D-GalNAc in der TA-Biosynthese verantwortlich ist. Dies lässt den Schluss zu, dass im R6Cho<sup>-</sup> wahrscheinlich nur ein

D-GalNAc in der LTA vorliegt, vergleichbar zu der aus *S. oralis* [55]. Weiterhin sind im *licD3*-Genlokus des R6Cho<sup>-</sup> Stammes LicD4 und Sor\_0763 enthalten. Dabei zeigt LicD4 eine 35%ige bzw. eine 32%ige Identität zu dem C-Terminus von LicD1 bzw. LicD2 von *S. pneumoniae*. Wie in dieser Arbeit beschrieben und struktur-chemisch nachgewiesen wurde (siehe **Kapitel 4.2**), katalysieren LicD1 und LicD2 in *S. pneumoniae* die Übertragung von jeweils einem *P*-Cho-Substituenten an die *O*-6-Position von  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-GalpNAc. In *S. oralis* liegt, wie bereits in **Kapitel 1.4** erläutert wurde, an der *O*-3- und an der *O*-6-Position des GalNAcs jeweils ein *P*-Cho-Substituent vor. Aufgrund der beschriebenen Sequenzidentität von LicD4 mit LicD1 bzw. LicD2 von *S. pneumoniae* wird vermutet, dass LicD4 in der LTA von *S. oralis* ebenfalls maßgeblich zur Anheftung von *P*-Cho-Substituenten beiträgt. Ferner stellt Sor\_0763 ein Protein dar, welches eine begrenzte Homologie zur LicD-Domäne aufweist [39, 55] und daher eine genauere Betrachtung wert ist. Aufgrund dieser Kenntnisse konnten Rückschlüsse hinsichtlich der zu erwartenden LTA-Struktur für den Stamm D39Cho<sup>-</sup> getroffen werden. Durch das Vorhandensein der Glykosyltransferase Sor\_0761, des Proteins LicD4 und des Proteins Sor\_0763 ist eine LTA mit nur einem GalNAc-Rest zu erwarten, welche an *O*-3- und *O*-6-Position jeweils mit einem *P*-Cho substituiert ist. LicD4 aus *S. oralis* werden zwei Funktionen zugesprochen, die erste ist die bereits erwähnte Anheftung von *P*-Cho-Substituenten an die TA, wobei vermutet wird, dass diese Funktion in der C-terminalen Region lokalisiert ist. Zweitens wird der N-terminalen Region von LicD4 die Funktion als Polymerase zugesprochen [39]. Weiterhin ist im *licD3*-Genlokus des *S. pneumoniae* Stammes R6Cho<sup>-</sup> LicD3 aus *S. oralis* lokalisiert, wodurch ein 1,2-verknüpftes Ribitol in der LTA zu erwarten ist. Damit lässt sich folgende Struktur pro RU vorhersagen: [3,6-*O*-di-*P*-Cho]- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-(1-*P* $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-AATGal-(1 $\rightarrow$ ).

Das Protein Sor\_0764, welches für eine Phosphorylcholin Esterase (Pce) kodiert, ist ebenfalls im übertragenen *licD3*-Genlokus enthalten.

Die Pce liegt jedoch in *S. oralis* gekürzt vor und ist dadurch nicht funktional [39], was Strukturuntersuchungen isolierter LTA aus *S. oralis* untermauern [55]. Jedoch ist die Pce aus dem *S. pneumoniae* außerhalb des *licD3*-Genlokus lokalisiert und funktional, wodurch eine Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten zu erwarten ist.

Eine zusätzliche Deletion von LicA im Stamm D39Cho<sup>-</sup> unterbindet die Phosphorylierung des Cholin (siehe **Kapitel 1.3, Abbildung 6**), wodurch es im Folgenden nicht zu einer Aktivierung mittels LicB und keiner anschließenden Übertragung des CDP-Cholin-Substrates kommt. Bei dem daraus resultierenden Stamm handelt es sich um D39Cho<sup>-</sup> licA64. Zusätzlich exprimiert R6Cho<sup>-</sup> das TacF Protein aus *S. oralis* und nicht aus *S. pneumoniae*. Dies hat zur Folge, dass der Und-PP-Vorläufer auch ohne *P*-Cho-Substitution durch die Zellwand geschleust wird. Daher ist anzunehmen, dass die LTA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup> licA64 ebenfalls nur einen GalNAc-Substituenten aufweist, der seinerseits jedoch

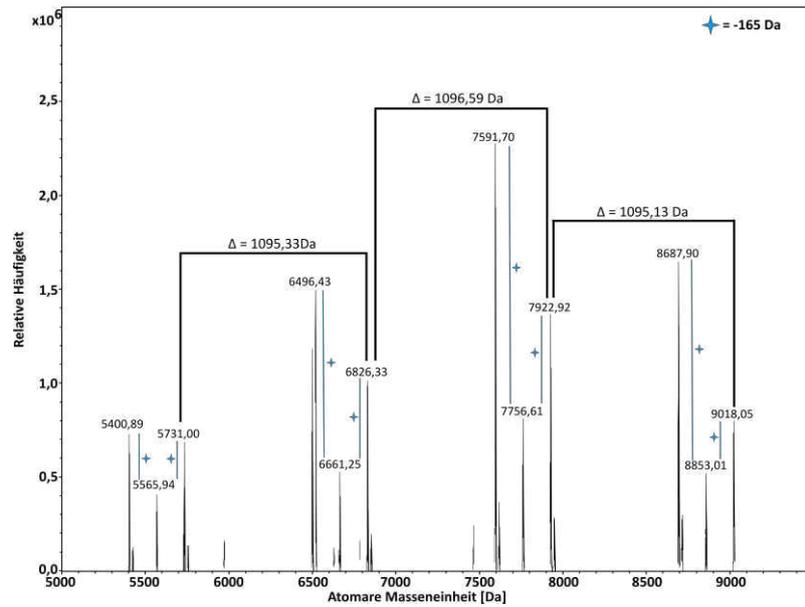
höchstwahrscheinlich über keine *P*-Cho-Substituenten verfügt. Die bisher aufgestellten Überlegungen und Hypothesen zur Struktur hinsichtlich der LTA aus den Stämmen D39Cho<sup>-</sup> und D39Cho<sup>-</sup>licA64 sollen im Folgenden mittels NMR- und MS-Untersuchungen eingehender betrachtet werden.

Hierfür erfolgte die Extraktion und Isolierung der LTA nach den beschriebenen Protokollen (siehe **Kapitel 9.4.2** und **9.4.3**). Die Strukturanalytik mittels NMR und MS von der isolierten LTA erfolgte nach de-*O*-Acylierung. Strukturuntersuchungen an Hydrazin-behandelter LTA bieten zwei große Vorteile: Erstens führt die reduzierte Heterogenität zu weniger komplexen Massenspektren: Die Hydrazin-Behandlung bewirkt eine Hydrolyse der Fettsäureester sowie der D-Alanin-Ester. Auftretende Heterogenität kann dadurch lediglich auf eventuell nicht-stöchiometrisch vorhandene *P*-Cho-Substituenten und die vorliegende Kettenlänge zurückgeführt werden. Der zweite Vorteil besteht darin, dass aufgrund von fehlender Aggregatbildung in den NMR-Spektren eine bessere Auflösung erreicht werden kann.

## 5.1 Strukturanalysen der LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho<sup>-</sup>

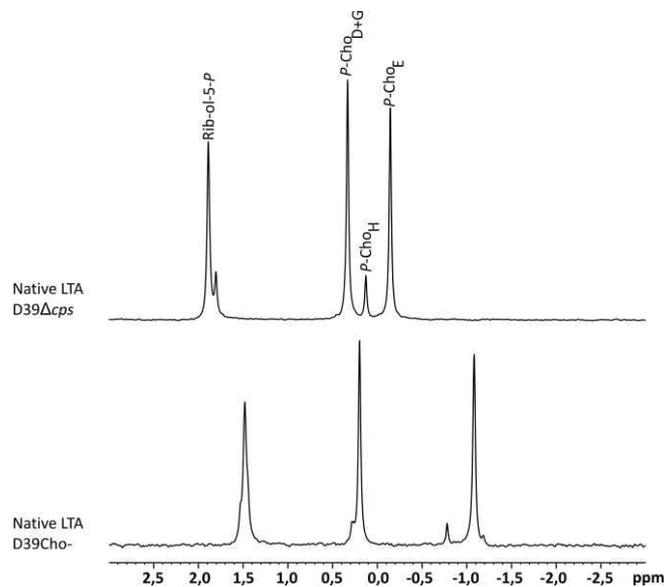
Anhand der MS-Daten (siehe **Abbildung 21**), des <sup>31</sup>P-NMR- (siehe **Abbildung 22**) und des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (siehe **Abbildung 23**) der de-*O*-acylierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup> war erkennbar, dass die Integration von *S. oralis* DNA einen Einfluss auf die LTA-Struktur von *S. pneumoniae* ausübt. Das dekonvulierte Massenspektrum der isolierten, de-*O*-acylierten LTA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup> zeigte zwei Signale bei 5731,00 Da und 6826,33 Da mit einer Massendifferenz von 1095,33 Da. De-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce* besitzt dagegen eine Differenz von 1298,44 Da zwischen einzelnen *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten (siehe **Abbildung 13**).

Dieser Vergleich lässt bereits auf eine veränderte LTA-Struktur schließen. Des Weiteren wurde eine Serie von Signalen mit Massendifferenzen von jeweils –165 Da (siehe **Abbildung 21**, [blaues Kreuz](#)) gefunden. Dies lässt sich auf die Hydrolyse von jeweils einem *P*-Cho-Substituenten zurückführen.



**Abbildung 21:** Massenspektrum (Bereich von 5000-9500 Da, gemessen mit einer Kollisionsenergie von 5 V) der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho<sup>-</sup>. Der Massenverlust von -165 Da, was jeweils einem P-Cho-Substituenten entspricht, ist mit einem Stern gekennzeichnet.

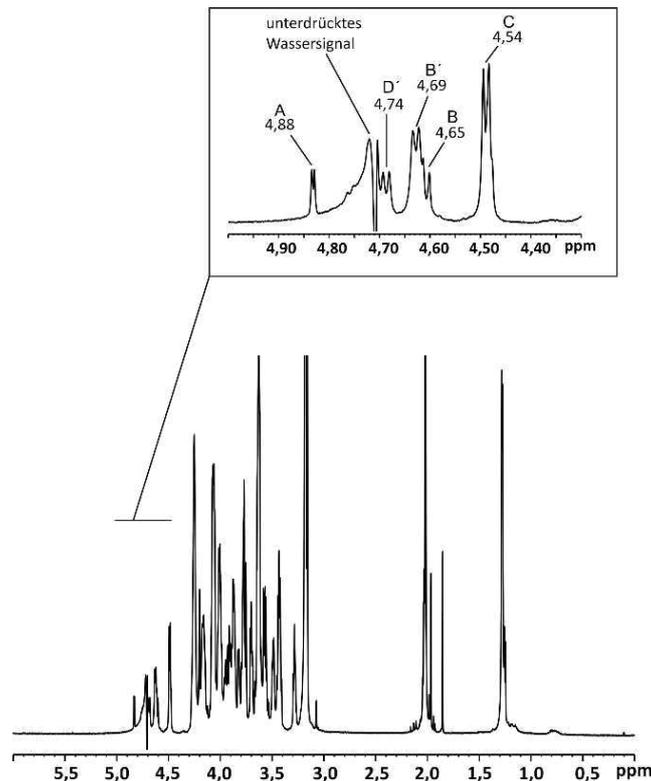
Beim Vergleich der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren der de-O-acylierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup> mit der LTA aus *S. pneumoniae* D39Δcps deutete sich bereits ein unterschiedliches P-Cho-Substitutionsmuster an (siehe **Abbildung 22**).



**Abbildung 22:** Die Integration des *licD3*-Genlokus von dem *S. oralis* Stamm ATCC 35037 in den *S. pneumoniae* Stamm D39 führt zu einem veränderten P-Cho-Substitutionsmuster. Vergleich der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren ( $\delta_P$  3-(-3); D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz) für die LTA aus D39Δcps (oberes Spektrum) und für die LTA aus D39Cho<sup>-</sup> (unteres Spektrum). Die Signale für die de-O-acylierte LTA aus D39Δcps lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol-*P*<sub>C</sub>  $\delta_P$  = 1,89 ppm; Rib-ol-5-*P*<sub>C</sub>  $\delta_P$  = 1,80 ppm; *P*-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_P$  = 0,33 ppm; *P*-Cho<sub>H</sub>  $\delta_P$  = 0,13 ppm; *P*-Cho<sub>E</sub>  $\delta_P$  = -0,15 ppm.

Durch <sup>1</sup>H-NMR-Messungen konnten im anomeren Bereich von  $\delta_H$  5,00 bis 4,30 ppm fünf Dupletts (siehe **Abbildung 23**, Ausschnitt) beobachtet werden. In der LTA aus den *S. pneumoniae* Stämmen

TIGR4 und D39 [34], sowie dem *S. oralis* Stamm Uo5 [55] ließen sich im anomeren Bereich bis zu 9 Dupletts aufweisen. Dies lässt auf eine reduzierte LTA-Struktur in dem Stamm D39Cho- schließen.



**Abbildung 23:** Wasserunterdrücktes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\delta_{\text{H}}$  6-0;  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho. Im Ausschnitt ist der Bereich anomerer Protonen von  $\delta_{\text{H}}$  5,0-4,3 ppm dargestellt inklusive der Zuordnung der einzelnen Signale.

Anhand der Kopplungskonstante der verschiedenen Protonen im anomeren Bereich ließen sich Rückschlüsse auf die vorliegende Konfiguration ziehen. Dabei ergab sich für das anomere Proton A ( $\delta_{\text{H}}$  4,88 ppm) eine Kopplungskonstante  $^3J_{\text{H,H}}$  von 3,64 Hz, welches auf eine  $\alpha$ -Konfiguration hindeutet. Die weitere Zuordnung der Protonen in den einzelnen Spinsystemen erfolgte unter Verwendung von  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY-Experimenten. Mit Hilfe des  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-Experiments konnten die jeweiligen direkten Nachbarprotonen ermittelt werden. Ausgehend vom Signal des anomeren Protons A bei einer chemischen Verschiebung von 4,88 ppm konnten im  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-Experiment die weiteren Signale des Zuckers A bei 3,62 – 3,59 ppm (H-2), 3,82 – 3,79 ppm (H-3) und 3,49 – 3,45 ppm (H-4) zugeordnet werden. Anhand des  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY-Experiments konnten dann zusätzlich die entsprechenden Protonen an Position 5 und 6 ermittelt werden (H-5,  $\delta_{\text{H}}$  = 3,69 – 3,66 ppm; H-6,  $\delta_{\text{H}}$  = 3,84 – 3,80 ppm). Die Bestimmung der jeweiligen Spinsysteme für alle weiteren anomeren Protonen erfolgte nach analogem Vorgehen.

Mit dem HSQC-Experiment erfolgte, ausgehend von den  $^1\text{H}$ -Signalen, die Bestimmung der entsprechenden  $^{13}\text{C}$ -Signale, da sich hier  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen über jeweils eine Bindung ( $^1J$ ) nachweisen lassen. Eine vollständige Tabelle (siehe **Tabelle 20**) mit den chemischen Verschiebungen der einzelnen

Zucker ist dem **Kapitel 10.4** zu entnehmen. Zusätzlich ist dort das HSQC-Spektrum der de-*O*-acylierten LTA des Stammes D39Cho<sup>-</sup> (siehe **Abbildung 53**) sowie der Zuordnung der einzelnen Signale dargestellt. Die Zuordnung des Spinsystems für das anomere Proton D´ erwies sich aufgrund der Überlagerung mit dem Wassersignal als schwierig (siehe **Abbildung 23**, Ausschnitt). Durch Abkühlen der Messtemperatur um 5 K auf 295 K erfolgte eine Verschiebung des Signalsatzes, wodurch das anomere Proton von D´ sich nicht mehr mit dem Wassersignal überlagerte. Dies ermöglicht eine klare Zuordnung, analog zu dem zuvor beschriebenen Vorgehen. Da im COSY- und TOCSY-Experiment die Kreuzsignale für D´ geringere Intensitäten aufwiesen, lieferten selektive COSY-Experimente weitere Hinweise zu den chemischen Verschiebungen der Protonen des Ringsystems.

Die anomeren Protonen ließen sich zu folgenden Zuckern zuordnen: **A** = α-D-Glcp, **B** = β-AATGalp, **C** = β-D-Glc, **D** = β-D-GalpNAc, **B´** = β-AATGalp, **D´** = β-D-GalpNAc<sub>term</sub>. Mittels eines <sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P-HMQC-TOCSY-Experiments konnten an den β-D-GalpNAc innerhalb der RU sowie am Terminus jeweils zwei *P*-Cho-Substituenten nachgewiesen werden. Dabei ließen sich, wie in der LTA von *S. oralis*, die *P*-Cho-Substituenten zu der *O*-3- und *O*-6-Position zuordnen, woraus sich folgende Struktur ableiten lässt: [3,6-*O*-di-*P*-Cho]-β-D-GalpNAc. Mit Hilfe des <sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P-HMQC-Experiments sowie des <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-Experiments ließ sich zu der LTA von D39Cho<sup>-</sup> ein 1,2-verknüpftes Ribitol identisch zu der LTA aus *S. oralis* [55] zuordnen. Aus den NMR-Untersuchungen konnte zusammenfassend folgende LTA-Zusammensetzung für die *pseudo*-Tetrasaccharid-Einheiten von dem D39Cho<sup>-</sup>-Stamm ermittelt werden: (→4)-[3,6-*O*-di-*P*-Cho]-β-D-GalpNAc-(1→2)-Rib-ol-(1-*P*→6)-β-D-Glc-(1→3)-β-AATGal-(1→).

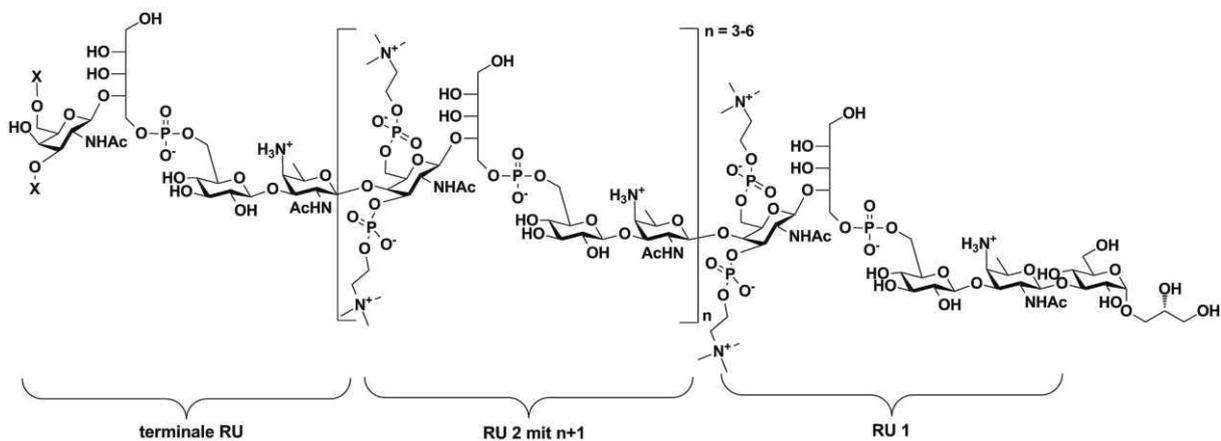
Dabei ergab sich für eine RU eine Masse von 1095,34 Da, die mit der zuvor aus dem MS (siehe **Abbildung 21**) ermittelten übereinstimmt. Eine Gegenüberstellung der berechneten und gemessenen Massen (siehe **Tabelle 10**) zeigte, dass für die LTA-Moleküle mit 5, 7 und 8 RU der monoisotopische Peak nicht detektierbar ist, sodass jeweils der zweite Isotopenpeak zur Identifizierung herangezogen wurde. Die geringe Empfindlichkeit des monoisotopischen Peaks lässt sich durch die Isotopenverteilung erklären. Mit steigender Molekülgröße sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass in einem Molekül ausschließlich die häufigsten natürlich vorkommenden Isotope enthalten sind. Ab einer gewissen Molekülgröße ist das monoisotopische Signal daher nur noch sehr schwach. In **Tabelle 10** sind LTA-Moleküle, in denen der zweite Isotopenpeak zur Identifizierung herangezogen wurde, mit einem Stern gekennzeichnet. Mehrmaliges Wiederholen der MS-Untersuchungen ergaben keine verbesserten Massenspektren. Folglich konnte keine bessere Massengenauigkeit erreicht werden.

Tabelle 10: Gegenüberstellung der berechneten und der gemessenen Massen sowie die ermittelte Massengenauigkeit für die verschiedenen Kettenlängen von der de-O-acylierten LTA von D39Cho. \* = Masse des zweiten Isotopenpeaks

Kettenlänge	berechnete Masse	gemessene Masse	Massengenauigkeit
	[Da]	[Da]	[Δppm]
<b>5</b>	5730,94	5731,00	10,5
- 1 P-Cho	5565,88	5565,94	10,8
- 2 P-Cho	5400,83	5400,89	11,1
<b>6</b>	6826,31	6826,33	2,9
- 1 P-Cho	6661,25	6661,25	0
- 2 P-Cho	6496,20	6496,43	35,4
<b>7</b>	7922,68*	7922,92*	30,3
- 1 P-Cho	7756,62	7756,61	-1,3
- 2 P-Cho	7591,56	7591,70	18,4
<b>8</b>	9018,05*	9018,05*	0
- 1 P-Cho	8852,99*	8853,01*	2,3
- 2 P-Cho	8687,94*	8687,90*	-4,6

Die Strukturuntersuchungen mittels NMR und MS zeigen deutlich, dass die Integration des *licD3*-Genlokus von *S. oralis* ATCC 35037 in die *licD3*-Region von *S. pneumoniae* einen wesentlichen Einfluss auf die LTA-Struktur hat und die vorhergesagte Struktur bestätigt werden konnte (siehe **Abbildung 24**).

X = H oder P-Cho

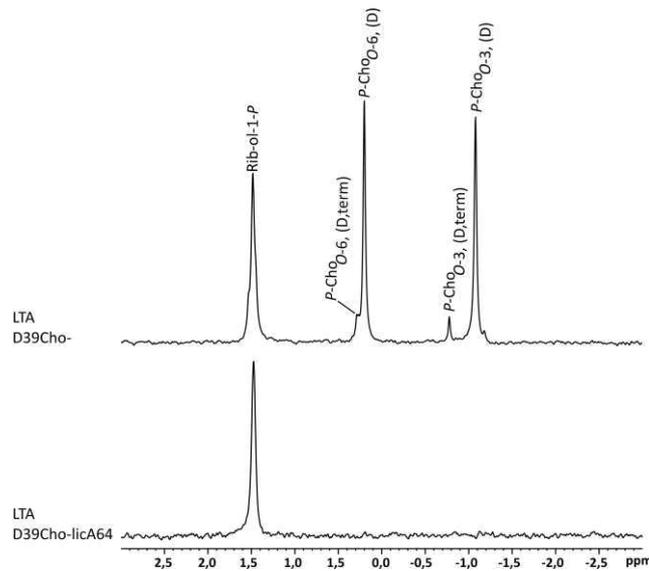


**Abbildung 24:** Struktur für die de-O-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho. Die LTA des *S. pneumoniae* Stammes D39Cho setzt sich aus repetitiven pseudo-Tetrasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen: (→4)-[3,6-O-di-P-Cho]-β-D-GalpNAc-(1→2)-Rib-ol-(1-P→6)-β-D-Glc-(1→3)-β-AATGal-(1→).

Wie zuvor postuliert, zeigte sich lediglich ein  $\beta$ -D-GalNAc-Rest pro RU, der jeweils mit einem *P*-Cho-Substituenten an der *O*-3- und an der *O*-6-Position substituiert ist. Welches Enzym dabei die Anheftung der *P*-Cho-Substituenten katalysiert, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Es liegt jedoch nahe, dass LicD4 aus *S. oralis* aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu LicD1 bzw. LicD2 von *S. pneumoniae*, für die *P*-Cho-Anheftung an der *O*-6-Position am  $\beta$ -D-GalNAc verantwortlich ist und Sor\_0763 die *P*-Cho-Anheftung an der *O*-3-Position katalysiert. Um die Frage der *P*-Cho-Anheftung im *S. oralis* genau zu klären, könnten weitere Untersuchungen mit LicD4- und Sor\_0763-Deletionsstämmen erfolgen. Im Massenspektrum der de-*O*-acylierten LTA zeigen sich, vergleichbar zu *S. pneumoniae*, jeweils zwei zusätzliche Signale zu jeder LTA einer bestimmten Kettenlänge mit einer Massendifferenz von  $-165$  Da. Diese entspricht, wie bereits im **Kapitel 4** erwähnt, einem *P*-Cho-Substituenten und ist ein Indiz für eine Pce-induzierte Hydrolyse. Dabei wird die Pce-induzierte Hydrolyse nicht durch die verkürzte Pce aus dem *S. oralis* hervorgerufen, sondern durch die Pce aus dem *S. pneumoniae* die außerhalb des *licD3*-Genlokus lokalisiert ist. Im Massenspektrum der de-*O*-acylierten LTA aus D39Cho- war eine leichte Verschiebung zu längeren Kettenlängen zu beobachten. In *S. pneumoniae* sind besonders 6 und 7 RU prägnant ausgebildet, in dem Stamm D39Cho- ließen sich zusätzlich 8 RU sehr deutlich beobachten. Um eine generelle Verschiebung zu längeren Kettenlängen zu bestätigen, müsste mindestens eine weitere Extraktion erfolgen. Weiterhin könnte in nachfolgenden Untersuchungen der PGN-WTA-Komplex analysiert werden.

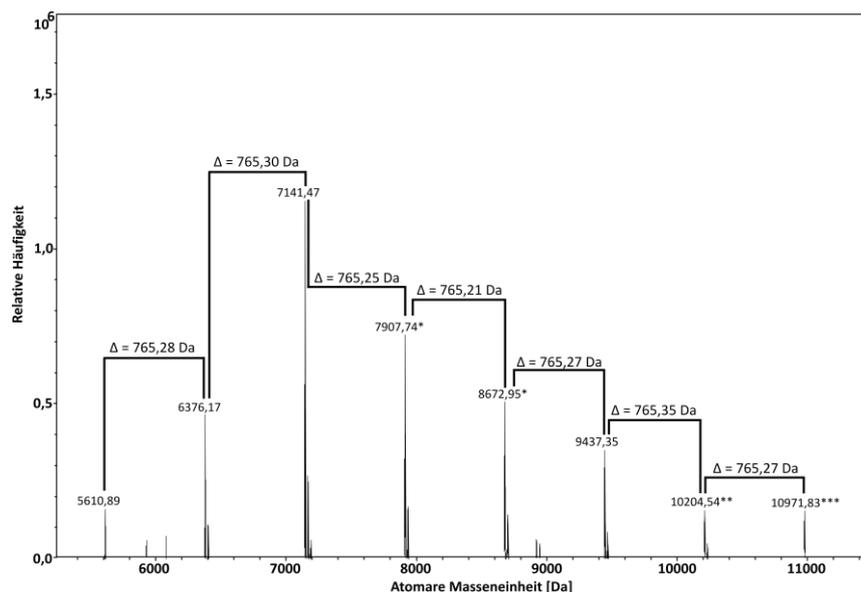
### 5.2 Strukturanalysen der LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho-licA64

Bereits im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigte sich, dass in der LTA aus D39Cho-licA64 keine *P*-Cho-Substitution vorliegt (siehe **Abbildung 25**), da in diesem Fall lediglich das Signal für Ribitol-Phosphat bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_P 1,47$  ppm zu beobachten war.



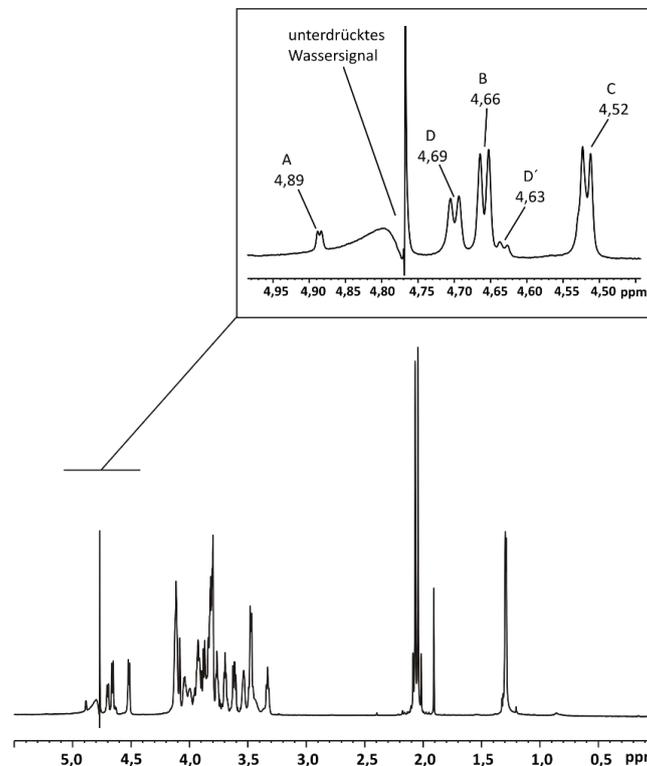
**Abbildung 25: Zusätzliche LicA-Deletion im *S. pneumoniae* Stamm D39Cho<sup>-</sup> führt zu einer LTA ohne P-Cho-Substituenten.** Vergleich der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren ( $\delta_P$  3-(−3), D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz) der de-O-acylierten LTA aus den Stämmen D39Cho<sup>-</sup> (oberes Spektrum) und D39Cho<sup>-</sup>licA64 (unteres Spektrum). Die Signale für die de-O-acylierte LTA aus D39Cho<sup>-</sup> lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol-P  $\delta_P = 1,48$  ppm; P-Cho<sub>D,term</sub>(O-6)  $\delta_P = 0,27$  ppm; P-Cho<sub>D</sub>(O-6)  $\delta_P = 0,20$  ppm; P-Cho<sub>D,term</sub>(O-3)  $\delta_P = -0,78$  ppm; P-Cho<sub>D</sub>(O-3)  $\delta_P = -1,08$  ppm. Das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der LTA von D39Cho<sup>-</sup>licA64 enthält lediglich das Rib-ol-Phosphat-Signal bei 1,47 ppm.

Im dazugehörigen Massenspektrum ließ sich im Durchschnitt eine Massendifferenz von 765,28 Da zwischen den einzelnen Kettenlängen beobachten (siehe **Abbildung 26**). Bei einem Vergleich mit der durchschnittlichen Masse für eine RU des Stammes D39Cho<sup>-</sup> (1095,33 Da) zeigte sich eine Massendifferenz von 330,05 Da, welche den fehlenden P-Cho-Substituenten entspricht. Für die Betrachtung der Massendifferenz wurde berücksichtigt, dass für einige LTA-Moleküle der zweite (\*), dritte (\*\*\*) bzw. fünfte (\*\*\*) Isotopenpeak betrachtet werden musste.



**Abbildung 26: Massenspektrum (Bereich 5250-11500 Da, gemessen mit einer Kollisionsenergie von 5 V) der de-O-acylierten LTA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64.** \*Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak, \*\*dritten Isotopenpeak, \*\*\*fünften Isotopenpeak.

Im wasserunterdrückten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten LTA des Stammes D39Cho<sup>-</sup>licA64 konnten im anomeren Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  5,00 bis 4,45 ppm auch an dieser Stelle wieder fünf Dupletts identifiziert werden (siehe **Abbildung 27**, Ausschnitt).



**Abbildung 27:** Ausschnitt des wasserunterdrückten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) sowie die Zuordnung der Signale im anomeren Bereich von der isolierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup>licA64. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt einen Ausschnitt von  $\delta_{\text{H}}$  5,50-0,00. Im Kasten ist der anomere Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  5,00-4,45 dargestellt.

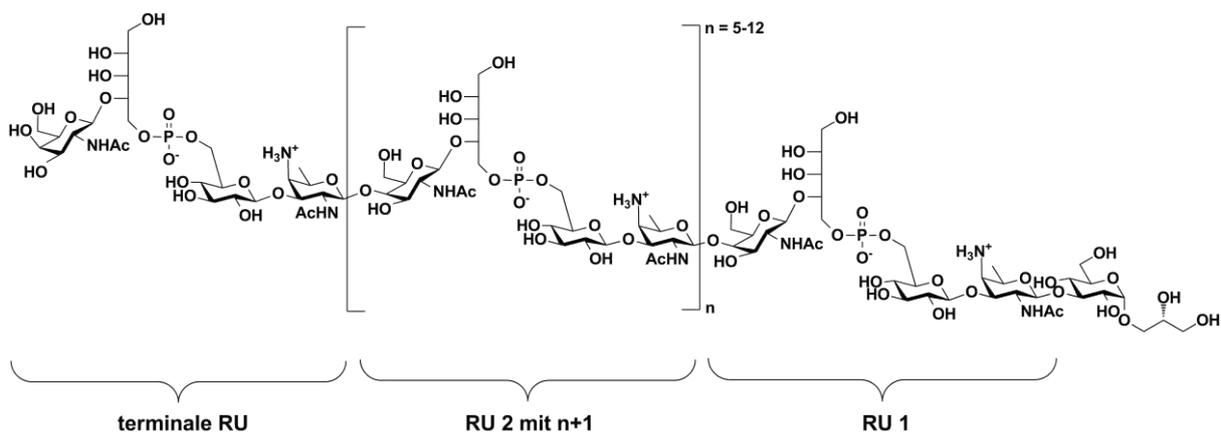
Die Zuordnung der einzelnen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne für die verschiedenen Spinsysteme der de-*O*-acylierten LTA von D39Cho<sup>-</sup>licA64 erfolgte an dieser Stelle auf analogem Wege (wie in **Kapitel 5.1** beschrieben) über  $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -,  $^1\text{H},^1\text{H-TOCSY}$ - sowie über  $^1\text{H},^{13}\text{C-HSQC}$ -Experimente. Auch hier ließen sich die Verknüpfungen der einzelnen Spinsysteme untereinander durch HSQC-TOCSY- und HMBC-Experimente ermitteln. Bei einem Vergleich der chemischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffkerne sowie der Verknüpfungen der einzelnen Spinsysteme der de-*O*-acylierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup> mit der de-*O*-acylierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup>licA64 zeigte sich – mit Ausnahme der *P*-Cho-Substitution – erwartungsgemäß eine identische Struktur. Die anomeren Protonen ließen sich also auch hier folgenden Zuckern zuordnen: **A** =  $\alpha\text{-D-Glcp}$ , **B** =  $\beta\text{-AATGal}$ , **C** =  $\beta\text{-D-Glc}$ , **D** =  $\beta\text{-D-GalNAc}$ , **B'** =  $\beta\text{-AATGal}$ , **D'** =  $\beta\text{-D-GalNAc}_{\text{term}}$ . Dem **Kapitel 10.5** ist eine vollständige Tabelle (siehe **Tabelle 21**) sowie das dazugehörige HSQC-Spektrum (siehe **Abbildung 55**) mit der Zuordnung der einzelnen Signale zu entnehmen. Aus den NMR-Untersuchungen konnte zusammenfassend folgende LTA-Zusammensetzung für die *pseudo*-Tetrasaccharid-Einheiten des D39Cho<sup>-</sup>licA64-Stammes ermittelt werden:  $(\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}(1\rightarrow 2)\text{-Rib-ol}(1\text{-}P\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glc}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-AATGal}(1\rightarrow)$ .

Dabei ergab sich eine Masse von 765,28 Da für eine RU, welche mit der beobachteten Massendifferenz übereinstimmt. Weiterhin konnten Kettenlängen von 7 bis 14 RU beobachtet werden (siehe **Abbildung 26**). Bei einem Vergleich der berechneten und gemessenen Massen der verschiedenen Kettenlängen zeigte sich, dass für 7 und 8 RU eine hohe Übereinstimmung vorliegt, wohingegen ab 10 RU jeweils nur noch der zweite, dritte bzw. fünfte Isotopenpeak identifiziert werden konnte (siehe **Tabelle 11**).

**Tabelle 11: Gegenüberstellung der berechneten und der gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit für die verschiedenen Kettenlängen der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho:licA64.** \*Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak; \*\*dritter Isotopenpeak, \*\*\*fünfter Isotopenpeak.

Kettenlänge	berechnete Masse	gemessene Masse	Massengenauigkeit
	[Da]	[Da]	[Δppm]
7	5610,90	5610,89	-1,8
8	6376,16	6376,17	1,6
9	7141,41	7141,47	8,4
10	7907,67*	7907,74*	8,9
11	8672,93*	8672,95*	2,3
12	9437,18	9437,35	18,0
13	10204,45**	10204,54**	8,8
14	10971,71***	10971,83***	10,9

Anhand der Informationen aus NMR- und MS-Messungen lässt sich folgende Struktur (siehe **Abbildung 28**) ableiten:



**Abbildung 28: Struktur für die de-O-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho:licA64.** Die LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho:licA64 setzt sich aus repetitiven pseudo-Tetrasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen: (→4)-β-D-GalpNAc-(1→2)-Rib-ol-(1-P→6)-β-D-Glc-(1→3)-β-AATGal-(1→).

In bisherigen Studien wurde der Einfluss einer Integration von *S. oralis* DNA in den *licD3*-Genloкус von *S. pneumoniae* unter biologischen Aspekten diskutiert. Der direkte Einfluss auf die LTA-Struktur wurde bis jetzt allerdings noch nicht untersucht [47, 56, 77]. Den bisherigen Daten ist zu entnehmen, dass der resultierende Stamm zwar in einer normalen Generationszeit wächst, dabei jedoch anstatt der typischen Diplokokkenform lange Ketten ausbildet. Weiterhin zeichnet sich diese Mutante durch eine Resistenz gegenüber Desoxycholat- oder Penicillin-induzierter Lyse aus. Autolyse-Anzeichen, welche in der stationären Phase zu erwarten wären, konnten nicht beobachtet werden. In Elektronenmikroskopie-Aufnahmen waren keine relevanten Veränderungen der Zellwand ersichtlich und es konnte auch kein Einfluss auf die Zellwanddicke verzeichnet werden [56]. Durch Strukturanalysen mit NMR- und MS-Messungen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die LTA-Struktur im D39Cho<sup>-</sup>-Stamm Strukturanteile sowohl von *S. pneumoniae* als auch von *S. oralis* aufweist (siehe **Kapitel 5.1, Abbildung 24**). Im Massenspektrum der de-*O*-acylierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup> war auffallend, dass die LTA zu höheren Kettenlängen verschoben ist. Da die Extraktion der LTA erst an einer Kultur durchgeführt wurde, konnte dieses Phänomen erst einmal beobachtet werden. Perspektivisch ist eine Wiederholung der LTA-Isolierung mit anschließender MS-Analyse angestrebt. Wenn in weiteren Kulturen für die TA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64 ebenfalls eine solche deutliche Verschiebung zu längeren Kettenlängen beobachtet werden kann, sollte in Betracht gezogen werden, ob die Anzahl der RU mittels eines Enzyms reguliert wird. Dabei kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Kettenlänge über CBPs anschließend im extrazellulären Bereich reguliert bzw. reduziert wird. Wie bereits erwähnt, binden die CBPs über eine nicht-kovalente Bindung an die *P*-Cho-Substituenten der TA. Da in der isolierten LTA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64 keine *P*-Cho-Substituenten vorliegen, könnte an dieser Stelle keine Anbindung der CBPs erfolgen und entsprechend keine Regulierung der Kettenlänge. Perspektivisch sollte überprüft werden, ob die Verschiebung zu höheren Kettenlängen ebenfalls die Kettenlänge der WTA beeinflusst.

Über die *P*-Cho-Substituenten der TAs erfolgt eine nicht-kovalente Bindung mit CBPs, welche sich aus unterschiedlichen Domänen zusammensetzen. Die Gemeinsamkeit aller CBPs besteht darin, dass sie ein N- oder C-terminales Cholin-Bindemodul mit homologen Wiederholungen von 20 Aminosäuren besitzen, welche für die nicht-kovalente Bindung zum *P*-Cho der TAs verantwortlich sind. Jedoch ist nicht bekannt, welche TA-Kettenlängen die CBPs für die Bindung benötigen und ob die Bindung der *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc und bzw. oder am  $\beta$ -D-GalpNAc erfolgt. Um die Wechselwirkung der *P*-Cho-Substituenten der TA mit den CBPs in Co-Kristallisations-Experimenten zu untersuchen, werden TAs benötigt, die keine Heterogenität in ihren Kettenlängen aufweisen. Im **Kapitel 6** soll die Methodenentwicklung der Trennung nach Kettenlängen von *S. pneumoniae* LTA erläutert werden.

## 6. Etablierung einer Methode zur Trennung der LTA nach Kettenlänge

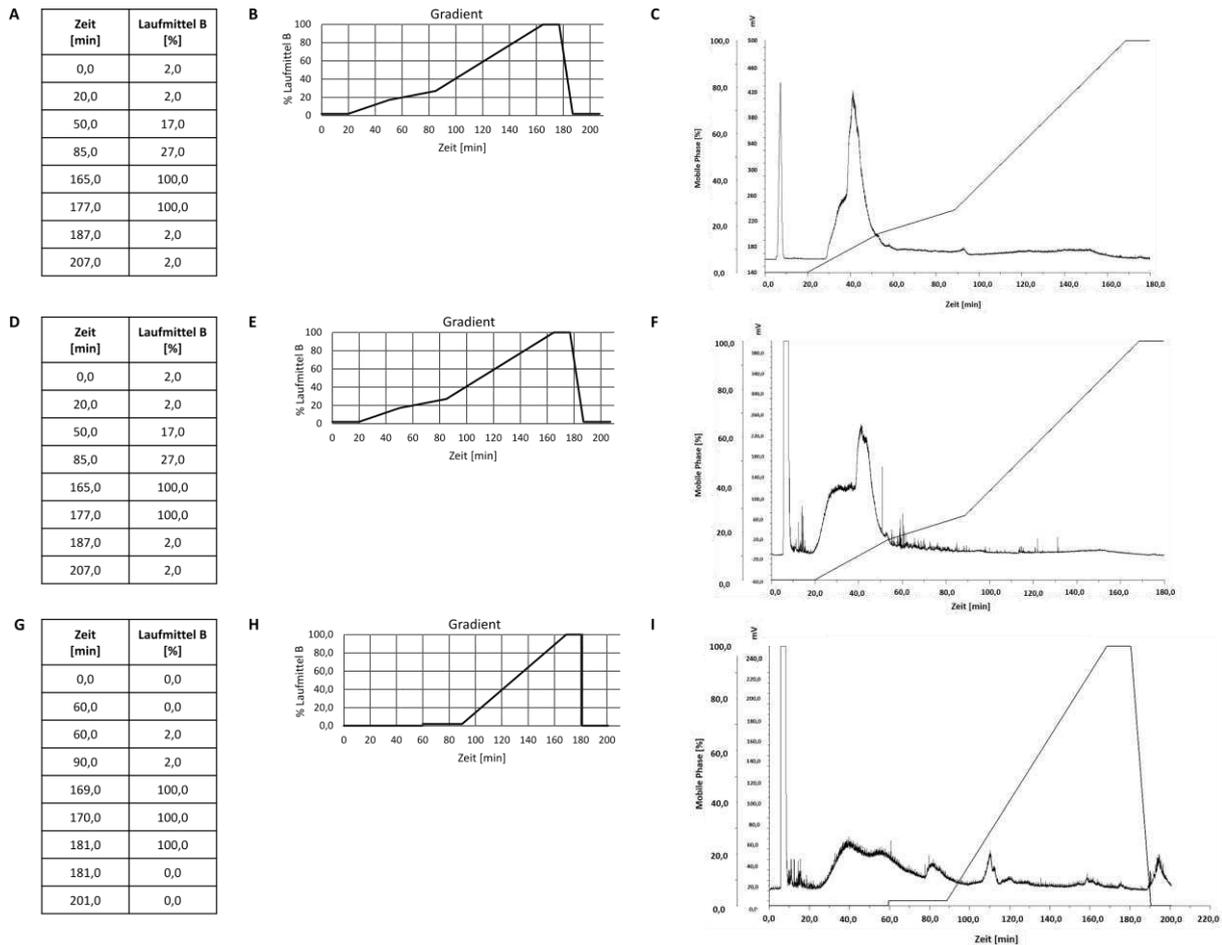
In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Dr. Juan A. Hermoso-Domínguez<sup>8</sup> sollte für Co-Kristallisationsstudien von CBPs mit TA eine Methode für die Trennung selbiger nach Kettenlänge entwickelt werden. Für solche Co-Kristallisationsstudien werden TA benötigt, die keine Heterogenität in ihren Kettenlängen aufweisen und ein klares *P*-Cho-Substitutionsmuster zeigen. Diese beiden Faktoren stellen essentielle Bedingungen dar, um ein klares Co-Kristallisations-Ergebnis zu erhalten. Die TA vom TIGR4Δ*cps*Δ*pce* stellen daher aufgrund ihrer vollständigen *P*-Cho-Substitution (siehe **Kapitel 4**) einen geeigneten Ausgangspunkt dar. Weitere Heterogenität in der Substitution der TA (z.B. Alanine, Fettsäuren) kann durch Hydrazinolyse reduziert bzw. ausgeschlossen werden (siehe **Kapitel 9.4.5**). Die ersten Versuche erfolgten bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Dissertation und die später verwendete Mutante lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Daher wurde für die ersten Trennungen nach Kettenlängen an verschiedenen Systemen die LTA aus dem Stamm D39Δ*cps*Δ*lgt* verwendet. Grundsätzlich können für die Trennung nach Kettenlänge zwei verschiedene Strategien verfolgt werden: In der ersten Strategie erfolgt zunächst die Trennung der LTA nach Kettenlänge und im Anschluss die Hydrolyse der Fettsäuren und der Alanin-Reste. In der zweiten Strategie erfolgt zu Beginn die Hydrazinolyse und anschließend die Trennung der *de-O*-acylierten LTA nach Kettenlänge.

### 6.1 Untersuchungen zur Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels RP-18-HPLC

Erste Versuche erfolgten unter Verwendung der Umkehrphasen (engl. Reversed-Phase; RP)-18-HPLC mit einer bereits in der Gruppe etablierten Methode. Diese wurde in früheren Untersuchungen für die chromatographische Trennung von Rauform-Lipopolysacchariden, freiem Lipid A sowie für weitere Lipide aus z.B. *E. coli* oder *Capnocytophaga canimorsus* (*C. canimorsus*) verwendet [79, 80]. Für die Versuche zur Trennung nach Kettenlänge mittels RP-18-HPLC wurde an dieser Stelle mit nativer LTA gearbeitet. Hierbei erfolgte zuerst die chromatographische Trennung und dann die Hydrazinolyse. In **Abbildung 29** sind der initial verwendete Gradient sowie das dazugehörige Chromatogramm dargestellt. Als Laufmittel A wurde ein Gemisch aus Methanol:Chloroform:Wasser in einem Verhältnis von 57:12:31 v/v/v mit 10 mM NH<sub>4</sub>OAc und als Laufmittel B Chloroform:Methanol in einem Verhältnis von 70,2:29,8 v/v/v mit 50 mM NH<sub>4</sub>OAc verwendet.

---

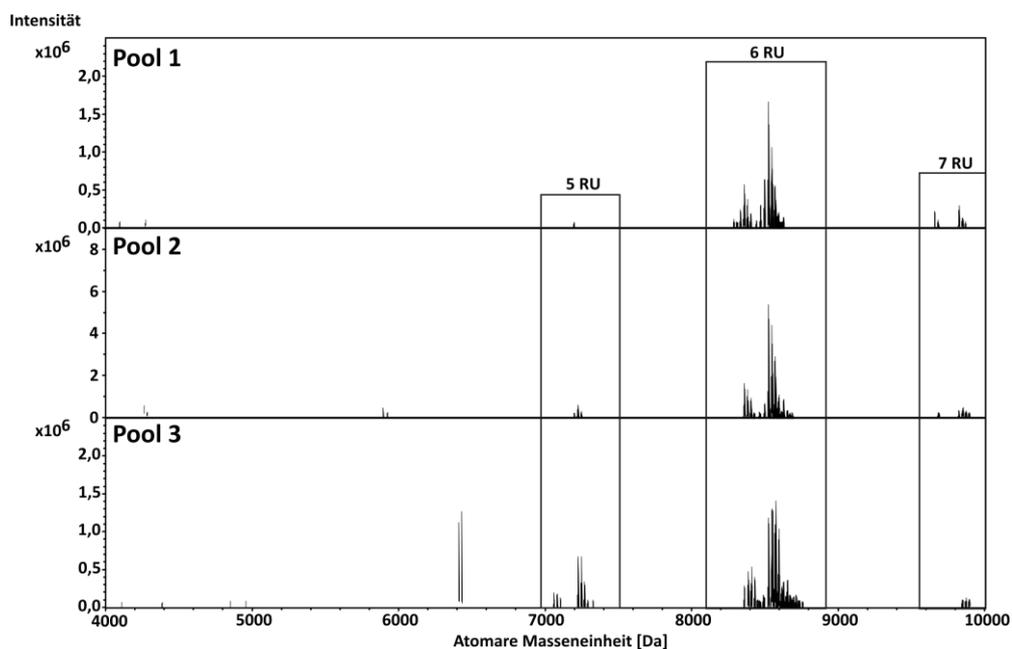
<sup>8</sup> Fachbereich Kristallographie und Strukturbiologie, Institut für Physikalische Chemie, Spanien



**Abbildung 29: Versuche zur Gradientenoptimierung für die chromatographische Trennung der LTA mit der RP-18-HPLC. (A-C) Gradienten und Bedingungen wie [79]. (D-F) Gradient wie zuvor plus EDTA-Zugabe zur Probe. (G-I) Optimierter Gradient zuzüglich der EDTA-Zugabe zur Probe. Laufmittel A: MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (57:12:31 v/v/v) + 10 mM NH<sub>4</sub>OAc; Laufmittel B: MeOH:CHCl<sub>3</sub> (29,8:70,2 v/v) + 50 mM NH<sub>4</sub>OAc.**

Wie **Abbildung 29 A** und **B** zu entnehmen ist, erfolgte zunächst ein initialer Schritt für 20 min bei 2% Laufmittel B. Anschließend erfolgte in drei Teilschritten (17%, 27% und 100%) ein linearer Gradient auf 100% Laufmittel B. Die Massenspektren der verschiedenen vereinten Fraktionen zeigten in den ersten Vorversuchen keine vollständige Trennung der LTA nach Kettenlänge. In den verschiedenen Fraktionen ließen sich mit einer geringen Intensität im Massenspektrum weitere Kettenlängen beobachten. Um eine Trennung der einzelnen Signale zu erreichen, wurde im nächsten Schritt versucht dies durch die Zugabe von EDTA zu ermöglichen. Bei LPS führt die Zugabe von EDTA zu einer Komplexierung von zweiwertigen Ionen und zu einem verbesserten Lösungsverhalten der Proben. Zunächst wurden die Bedingungen für die RP-18-HPLC wie im vorigen Versuch beibehalten. Die Zugabe von EDTA führte lediglich zu einer Verbreiterung der Signale. Die Massenspektren der verschiedenen Fraktionen verdeutlichten, dass die EDTA-Zugabe an dieser Stelle zu keiner Optimierung der Trennung führte. Es zeigte sich deutlich, dass die LTA mit 6 RU (8519,21 Da) in allen vier Fraktionen enthalten war.

Im nächsten Schritt wurde, aufgrund der Signalverbreitung durch die EDTA-Zugabe, der Gradient durch eine isokratische Stufe erweitert. Dafür lief die RP-18-HPLC zunächst auf 100% Laufmittel A (MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O 51:12:31 v/v/v) für 60 min und anschließend erfolgte ein isokratischer Schritt bei 2% Laufmittel B (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 70,2:29,8 v/v) für 30 min. Jedoch konnte auch in diesem Fall keine vollständige Trennung der LTA erreicht werden. **Abbildung 30** zeigt ein repräsentatives Massenspektrum der verschiedenen vereinten Fraktionen für die RP-18-HPLC mit verändertem Gradienten und EDTA-Zugabe (siehe **Abbildung 29, G bis I**). Es zeigte sich deutlich, dass die LTA mit einer Kettenlänge von 6 RU in allen Fraktionen prägnant zu beobachten war. Jedoch ließen sich auch die Moleküle mit einer Kettenlänge von 5 bzw. 7 RU mit geringen Intensitäten noch nachweisen. Dies bedeutete, dass auf diesem Wege keine vollständig homogenen Proben generiert werden konnten.

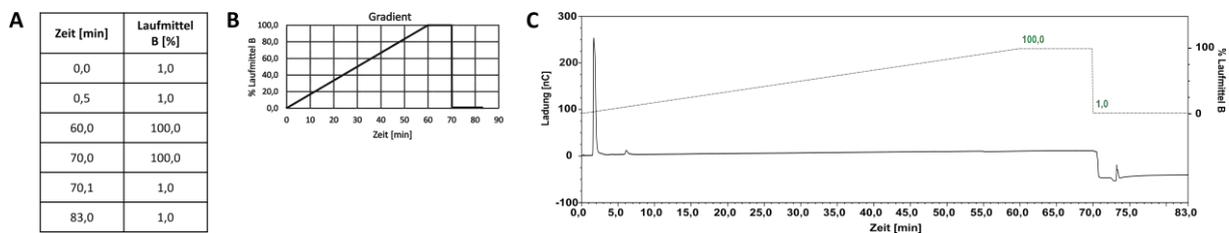


**Abbildung 30:** Massenspektren (Bereich von 4000-10000 Da, gemessen bei einer Kollisionsenergie von 15 V) für die RP-18-HPLC von dem *S. pneumoniae* Stamm D39Δ*cps*Δ*lgt*. Der Gradient sowie das dazugehörige Chromatogramm sind in der **Abbildung 29** dargestellt.

Des Weiteren wiesen die Proben nach Entsalzen mittels Ultra-Micro DispoDialyzer™ sowie nach Hydrazinolyse sehr geringe Auswaagen auf. Deshalb wurde im nächsten Schritt auf die in **Kapitel 6.2** beschriebene Anionen-Austausch-Chromatographie mit gepulster Detektion (HPAEC-PAD) gewechselt. Für diese Methode erfolgte ein Wechsel der Strategie, d.h. zunächst erfolgte die Hydrazinolyse der Proben und im Anschluss die Isolierung der verschiedenen *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten der LTA aus dem Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce*. Diese Methode wurde bereits in früheren Studien in der Gruppe zur Aufreinigung von Oligosacchariden aus *E. coli* hinsichtlich nativer Ladung und Größe bei nahezu neutralem pH-Wert verwendet [81].

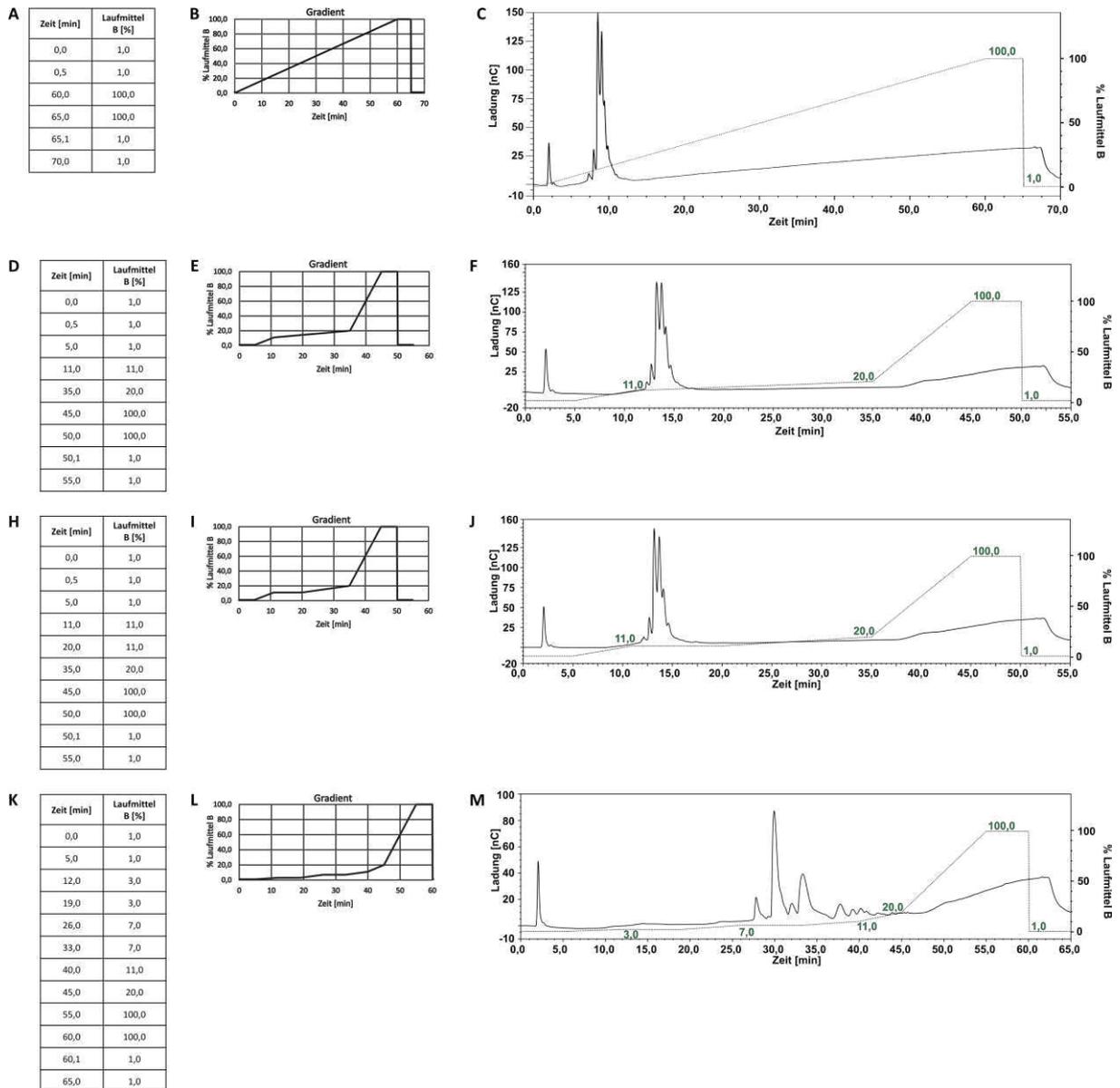
## 6.2 Chromatographische Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels HPAEC-PAD

Für die HPAEC-PAD erfolgte zunächst die Hydrazinolyse der LTA sowie die anschließende Aufreinigung. Alle Versuche mit der HPAEC-PAD, die Optimierung des Gradienten mit eingeschlossen, wurden zunächst im analytischen Maßstab auf einem separaten System, ausgestattet mit einer CarboPac PA100- oder PA1-Säule mit den Maßen 4 x 250 mm, durchgeführt. Dabei diente im analytischen Maßstab die PA1-Säule für die chromatographische Trennung bei nahezu neutralem pH-Wert und die PA100-Säule bei alkalischem pH-Wert. Versuche zur Trennung anhand der nativen Moleküle nach Ladung und Größe mit einem linearen Gradienten aus den Laufmitteln A (H<sub>2</sub>O) und B (1 M NaAc (pH 6,0)) zeigten aufgrund fehlender nativer Ladung der TA keine Retention (siehe **Abbildung 31**).



**Abbildung 31: Trennung der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4ΔcpsΔpce mittels HPAEC-PAD.** Neutrales System, Laufmittel A: H<sub>2</sub>O, Laufmittel B: NaAc (pH 6). **A+B)** Verwendeter Gradient im analytischen Maßstab im nahezu neutralen pH-Wert. **C)** Abbildung C zeigt das dazugehörige Chromatogramm.

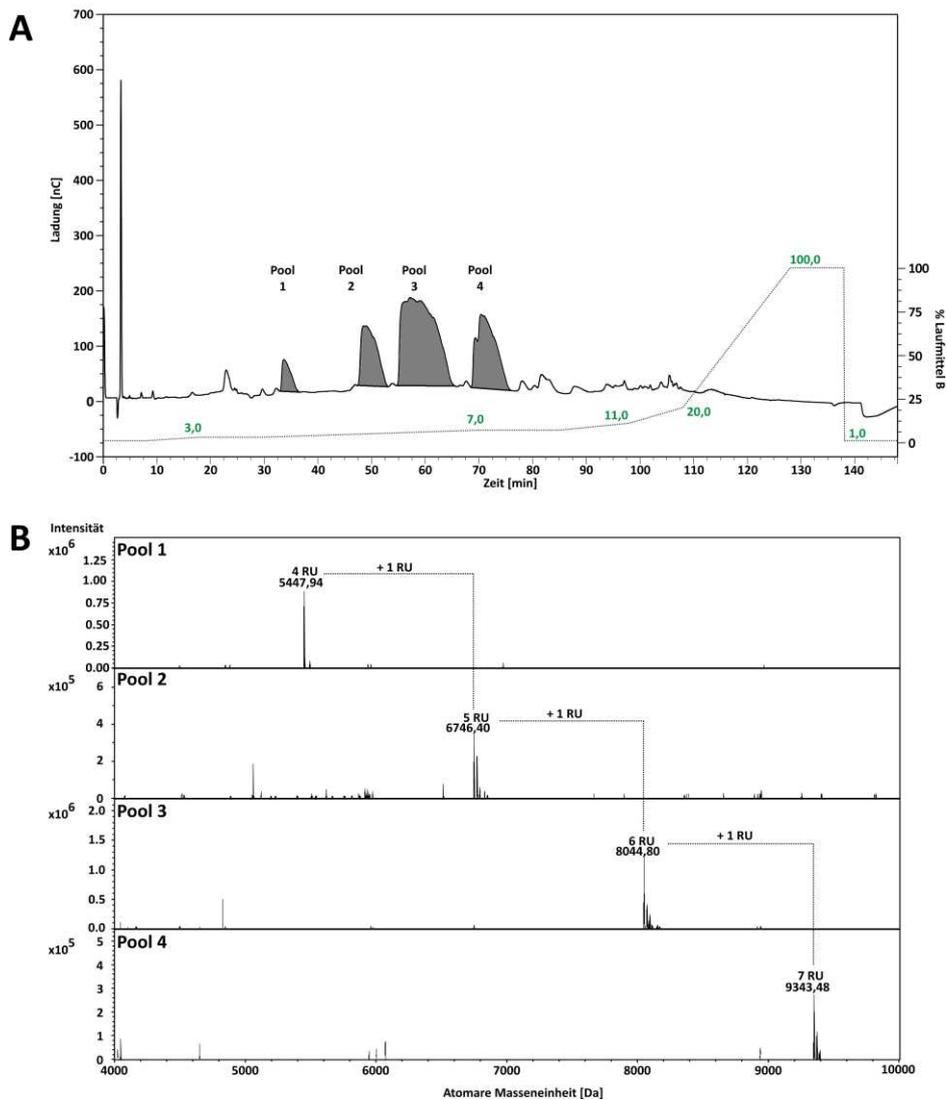
Daher wurde im Weiteren der Sachverhalt genutzt, dass Kohlenhydrate im alkalischen pH-Bereich Oxy-Anionen bilden. Hierfür wurde mit den Laufmitteln 0,1 M NaOH (Laufmittel A) und 1 M NaAc mit 0,1 M NaOH (Laufmittel B) gearbeitet. Im alkalischen pH-Bereich konnte durch den initialen Spülschritt mit 1% NaAc eine Verbesserung in der Retention im Vergleich zu dem Gradient ohne initialen Spülschritt erzielt werden (Vergleich siehe **Abbildung 32, A-C vs. D-F**). Jedoch wurde keine Optimierung der Trennung erzielt.



**Abbildung 32: Gradientenoptimierung für die chromatographische Trennung der LTA des Stammes TIGR4ΔcpsΔpce mittels HPAEC-PAD. (A-M)** Alkalisches System, Laufmittel A: 0,1 M NaOH, Laufmittel B: 1 M Na-Acetat + 0,1 M NaOH; **(A-C)** Methode II; **(D-F)** Methode III; **(G-I)** Methode IV; **(K-M)** Methode V. Methoden beschrieben in **Kapitel 9.4.9.2**. In grün dargestellt sind die %-Wertes des Gradienten.

Daher erfolgte im nächsten Versuch der Einbau eines isokratischen Schrittes bei 11% Laufmittel B (1 M NaAc mit 0,1 M NaOH) (siehe **Abbildung 32, H-J**). Auch hier zeigte sich keine optimierte Trennung der einzelnen Moleküle. Das Einfügen von zwei isokratischen Schritten bei 3% und 7% des Laufmittels B (1 M NaAc mit 0,1 M NaOH) führte zu einer guten Basislinientrennung der verschiedenen Signale (siehe **Abbildung 32, K-M**). Die Massenspektren der vereinten Fraktionen zeigten, dass mit diesem Gradienten eine Trennung nach Kettenlänge erreicht wurde. Für die Trennung im semi-präparativen Maßstab wurde auf ein HPAEC-PAD System mit einer CarboPac PA1-Säule (9 x 250 mm) gewechselt. Dabei erfolgte keine Änderung des Eluenten, jedoch wurden der Fluss sowie der Gradient an den semi-präparativen Maßstab angepasst.

Ein repräsentatives Chromatogramm der Trennung nach Kettenlänge für de-*O*-acylierte LTA mit dem semi-präparativen System ist in **Abbildung 33 A** dargestellt. Das Entsalzen der Proben bedurfte an dieser Stelle weiterer Optimierung. Für das analytische System wurden die lyophilisierten Fraktionen anschließend mittels GPC von Salzbestandteilen getrennt (siehe **Kapitel 9.4.9.3**). Jedoch zeigte sich für das semi-präparative System bei dem Reproduzieren der Trennung, dass der Lyophilisationsschritt zu einem unerwarteten Abbau der LTA in kleine Fragmente führte. Die Verringerung des NaOH- und NaAc-Gehaltes vor dem Lyophilisieren konnte durch Neutralisation und Dialyse erreicht werden (siehe **Kapitel 9.4.9.4**). Aus den dazugehörigen Massenspektren wurde ersichtlich, dass diese Strategie das gewünschte Ergebnis liefert: intakte LTA lässt sich somit erfolgreich nach Kettenlänge auftrennen (siehe **Abbildung 33 B**).



**Abbildung 33: Chromatographische Trennung der LTA mittels HPAEC-PAD führt zu homogenen LTA-Pools.** Repräsentatives Chromatogramm für die HPAEC-PAD (A) im semipräparativen Maßstab von der chromatographischen Trennung der LTA von dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce nach Kettenlänge. (A) Dargestellt ist das Chromatogramm inklusive der vereinten Fraktionen und dem dazugehörigen Gradienten. (B) Die dazugehörigen Massenspektren (gemessen mit einer Kollisionsenergie von 10 V) der vereinten Fraktionen (Pool). Die Abbildung zeigt einen Bereich von 4000-10000 Da.

Beim Vergleich der berechneten und gemessenen Massen für die unterschiedlichen *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten nach HPAEC-PAD zeigt sich eine gute Genauigkeit (siehe **Tabelle 12**). Dabei entsprechen, ausgehend von der injizierten Menge de-*O*-acylierter LTA ( $m = 2,483$  mg), die Ausbeuten der LTA mit verschiedenen Kettenlänge folgender prozentualer Verteilung: 4 RU ( $m = 0,394$  mg) mit 15,9%, 5 RU ( $m = 0,160$  mg) mit 6,4%, 6 RU ( $m = 0,647$  mg) mit 26,1% und 7 RU ( $m = 0,162$  mg) mit 6,5%.

**Tabelle 12:** Vergleich der berechneten und gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit der unterschiedlichen Pools nach HAPEC-PAD.

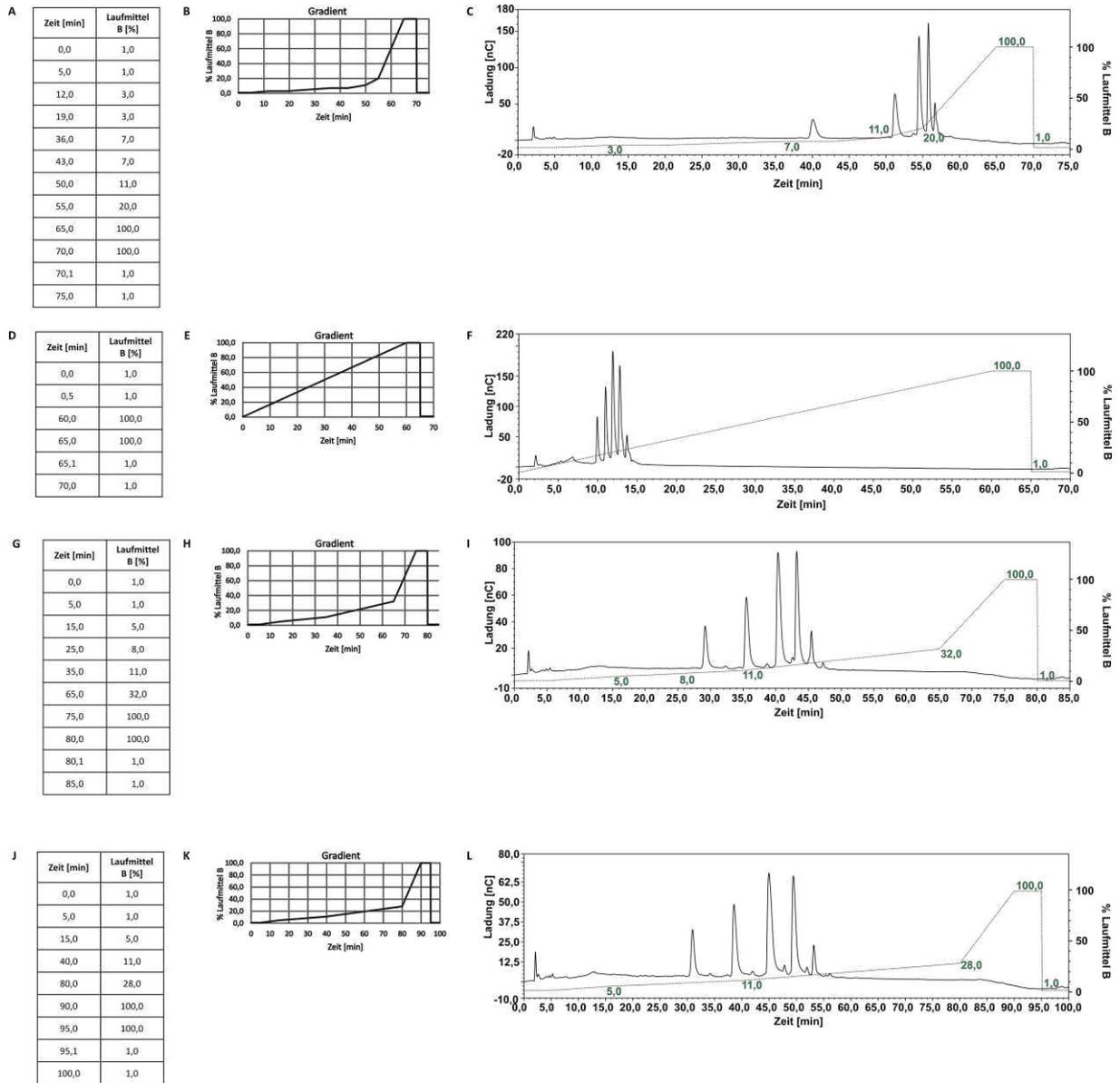
Massen der de- <i>O</i> -acylierte pnLTA von TIGR4 $\Delta$ <i>cps</i> $\Delta$ <i>pce</i>				
Pool	Anzahl der Kettenlänge	berechnete Massen [Da]	gemessene Massen [Da]	Massengenauigkeit [ $\Delta$ ppm]
1	4	5447,89	5447,94	9,2
2	5	6746,34	6746,40	8,9
3	6	8044,78	8044,80	2,5
4	7	9343,23	9343,48	26,8

Im nächsten Schritt wurde die etablierte Methode zur Trennung der LTA nach Kettenlänge für den Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* entsprechend angepasst. Wie im **Kapitel 4.2.** gezeigt werden konnte, weißt diese LTA lediglich eine *P*-Cho-Substitution pro RU auf. Hydrolyse-Versuche mit heterolog exprimierter *Pce* ließen bereits vermuten, dass für die Hydrolyse die *P*-Cho-Substituenten am  $\beta$ -D-GalpNAc für die Bindung nicht notwendig sind. Dieser Sachverhalt könnte mit Co-Kristallisationsversuchen mit inaktiver *Pce* weiter untermauert und analysiert werden. Im **Kapitel 6.3** soll die Gradienten-Optimierung für die Trennung nach Kettenlänge für die LTA aus den *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* erläutert werden.

### 6.3 Anwendung des HPAEC-PAD-System auf die LTA von TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2*

Für den *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* $\Delta$ *licD2* wurde zunächst die optimierte Methode vom TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* getestet. Dabei erfolgte auch hier die Trennung im alkalischen System mit den Laufmitteln 0,1 M NaOH (Laufmittel A) und 1 M NaAc mit 0,1 M NaOH (Laufmittel B). Erste Versuche sowie die Optimierung des Gradienten liefen auch an dieser Stelle im analytischen Maßstab auf einer separaten Anlage ausgestattet mit einer CarboPac PA100- und PA1-Säule (4 x 250 mm). Die **Abbildung 34 A bis C** zeigt den Gradienten sowie das dazugehörige Chromatogramm für die zuvor für de-*O*-

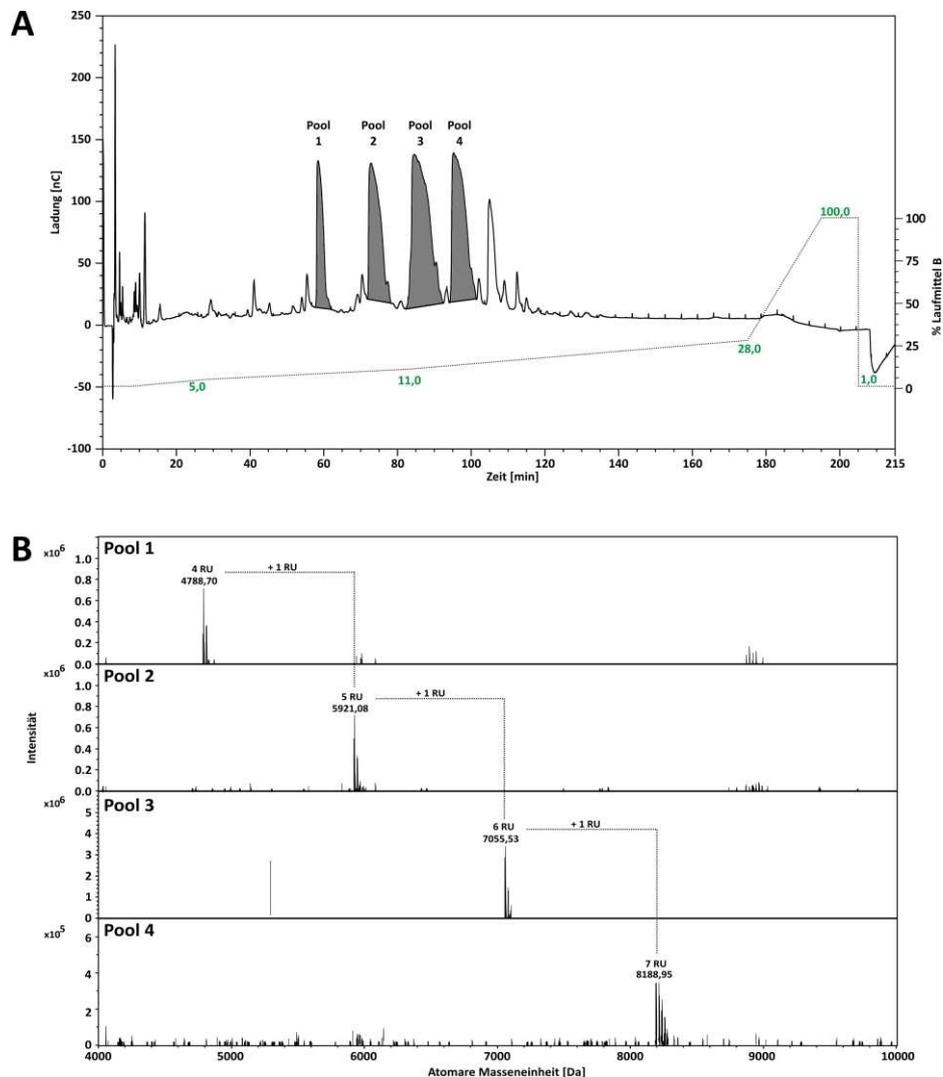
acylierte LTA von TIGR4Δ*cps*Δ*pce* optimierte Methode, auf die entsprechende LTA aus TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* angewendet.



**Abbildung 34: Gradientenoptimierung für die chromatographische Trennung der LTA des Stammes TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* mittels HPAEC-PAD. (A-L) Alkalisches System, Laufmittel A: 0,1 M NaOH, Laufmittel B: 1 M Na-Acetat + 0,1 M NaOH; (A-C) Methode V; (D-F) Methode II; (G-I) Methode VI; (J-L) Methode VII. Methoden beschrieben in Kapitel 9.4.9.2. In grün dargestellt sind die %-Werte des Gradienten.**

Die entsprechenden Fraktionen wurden auch hier im Anschluss dialysiert und mit MS analysiert. In den dazugehörigen Massenspektren zeigte sich, dass auch hier die LTA durch den eingebauten Dialyseschnitt intakt blieb. Jedoch ließen sich in den vereinten Fraktionen noch verschiedene Kettenlängen nachweisen, wodurch in diesem Fall eine weitere Optimierung des Gradienten notwendig war. Um zu bestimmen bei welcher Laufmittelzusammensetzung die Probe von der Säule eluiert, erfolgte die Messung mit einem linearen Gradienten (siehe **Abbildung 34, D-F**).

Aus beiden Chromatogrammen wurde deutlich, dass bereits bei einem geringen prozentualen Anteil an Laufmittel B (1 M NaAc mit 0,1 M NaOH) die Probe von der Säule eluiert. Eine Optimierung des Gradienten zeigte, dass eine sehr gute Trennung der einzelnen Signale erreicht werden konnte (siehe **Abbildung 34, G-I**). Die weitere Verlängerung der einzelnen Schritte im Gradienten ermöglichte eine weitere Optimierung der Trennung (siehe **Abbildung 34, J-L**). Zur Trennung im semi-präparativen Maßstab wurde auch hier auf ein HPAEC-PAD System mit einer CarboPac PA1-Säule (9 x 250 mm) gewechselt. Im Anschluss erfolgt auch hier ein Dialyseschritt zum Entsalzen der verschiedenen Fraktionen. Die **Abbildung 35** zeigt ein repräsentatives Chromatogramm sowie die dazugehörigen Massenspektren der vereinten Pools. Die vereinten Fraktionen sind im Chromatogramm grau hinterlegt. Das Massenspektrum unterstreicht nochmals die sehr gute Trennung, die bereits aus dem Chromatogramm zu vermuten war.



**Abbildung 35: Chromatographische Trennung der LTA des Stammes TIGR4ΔcpsΔpceΔlicD2 mittels HPAEC-PAD führt zu homogenen LTA-Pools.** Repräsentatives Chromatogramm (A) mit den gepoolten Fraktionen (grau hinterlegt) für die Trennung nach Kettenlänge für die isolierte, de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4ΔcpsΔpceΔlicD2 sowie die Massenspektren (Bereich von 4000-10000 Da, gemessen bei einer Kollisionsenergie von 15 V) (B) für die verschiedenen vereinten Fraktionen.

Ein Vergleich der berechneten sowie der gemessenen Massen für die verschiedenen Kettenlängen zeigte eine hohe Genauigkeit (siehe **Tabelle 13**), wobei für die LTA-Moleküle mit 4 bzw. 6 und 7 RU jeweils nur der zweite Isotopenpeak identifiziert werden konnte.

**Tabelle 13: Vergleich der berechneten und gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit für die unterschiedlichen Pools nach der Trennung mit der Anionen-Austausch-Chromatographie.** \*Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak.

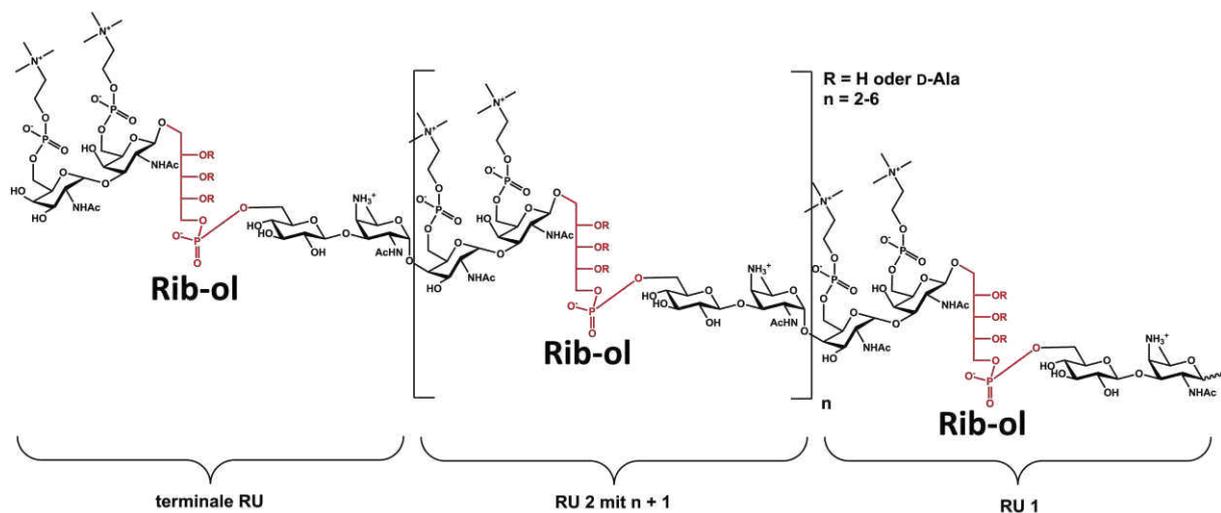
Massen der de-O-acylierte pnLTA von TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> Δ <i>licD2</i>				
Pool	Anzahl der Kettenlänge	berechnete Massen [Da]	gemessene Massen [Da]	Massengenauigkeit [Δppm]
1	4	4788,67*	4788,70*	6,3
2	5	5921,04	5921,08	6,8
3	6	7055,45*	7055,53*	11,3
4	7	8188,85*	8188,95*	12,2

Ausgehend von der injizierten Menge de-O-acylierter LTA (m = 2,119 mg) ergab sich folgende prozentuale Verteilung für die Ausbeute an LTA mit den verschiedenen Kettenlängen: 4 RU (m = 0,164 mg) mit 7,7%, 5 RU (m = 0,268 mg) mit 12,7%, 6 RU (m = 0,205 mg) mit 9,7% und 7 RU (m = 0,155 mg) mit 7,3%. Die optimierte Methode kann zukünftig im großen Maßstab genutzt werden, um isolierte und de-O-acylierte LTA von dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* nach Kettenlänge zu trennen und anschließend Bindungsstudien mit verschiedensten CBPs durchzuführen. Die bereits etablierte Methode konnte für die LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cps*Δ*pce*Δ*licD2* entsprechend angepasst und angewendet werden.

## 7. Untersuchungen hinsichtlich des LTA/WTA-Verhältnisses in der *S. pneumoniae* Zellwand mittels GC/MS

Bis heute ist wenig über das Verhältnis von LTA zu WTA in *S. pneumoniae* in der Literatur bekannt und publiziert. Einzig E.B. Briles und A. Tomasz publizierten im Jahr 1973 ein Verhältnis von 10% LTA und 90% WTA für *S. pneumoniae* [58]. Dabei erfolgte die Bestimmung über <sup>3</sup>H-markiertes Cholin in der Zellwand. Dafür wurden die Pneumokokken zunächst in einem Medium, welches [Methyl-<sup>3</sup>H]-Cholin-Chlorid enthielt, kultiviert. Anschließend erfolgte die Separierung der radioaktiv markierten WTA und LTA. Dabei zeigte sich, dass der größte Teil des <sup>3</sup>H-gelabelten Cholins in WTA-haltigen Fraktionen und nur ein kleiner Teil in LTA-haltigen Fraktionen integriert wurden.

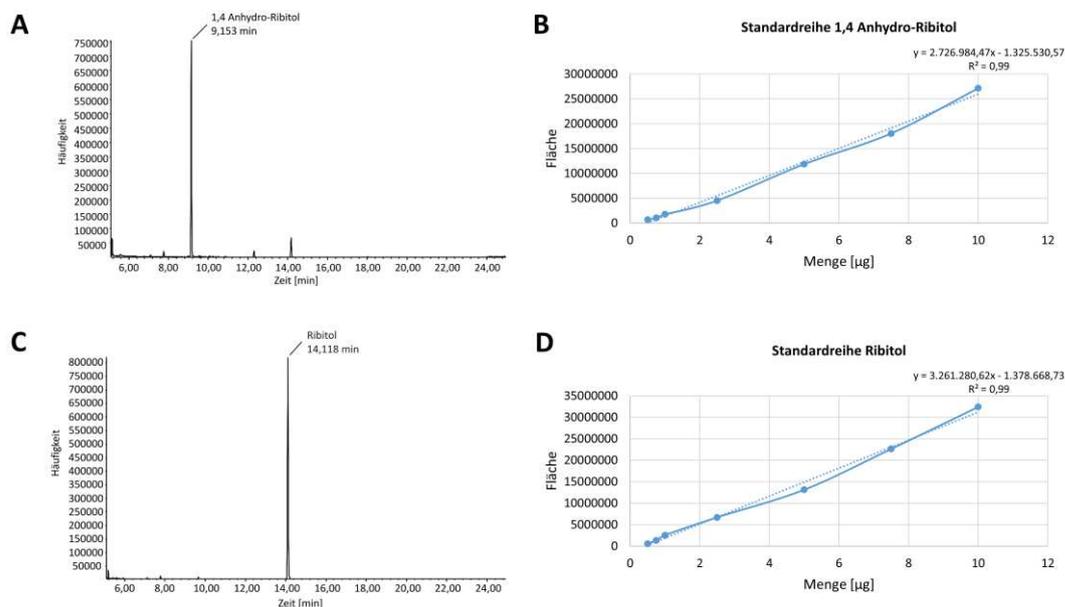
Für *S. oralis* konnte 1993 von D. S. Horne und A. Tomasz ein ähnliches LTA/WTA-Verhältnis ermittelt werden, dabei lag auch hier der WTA-Gehalt bei 80-90% und der LTA-Gehalt bei ca. 10% [59]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls mit radioaktiv-markierten Kulturen gearbeitet. Dabei wurde der *S. oralis* Stamm ATCC 35037 in einem mit L-[4,5-<sup>3</sup>H(N)]-Lysin versetztem Medium kultiviert. Diese beiden Arbeiten sind bis heute die einzigen Publikationen auf diesem Fachgebiet. Um das damals bestimmte Verhältnis zu überprüfen, sollte mit den nun deutlich umfassenderen Strukturkenntnissen der LTA und WTA von *S. pneumoniae* eine leichter zugängliche Methode für die Bestimmung des LTA/WTA-Verhältnisses etabliert werden. Bei einem Vergleich der verschiedenen Zellwand-Komponenten wie PGN, TA und Kapsel zeigte sich, dass Ribitol eine sehr gute Bezugsgröße für eine Quantifizierung darstellen könnte. Dieses ist lediglich in den TA von *S. pneumoniae* aber nicht in weiteren Zellwand-Bestandteilen vorhanden. In der **Abbildung 36** ist die TA-Struktur von *S. pneumoniae* dargestellt. Das Ribitol-5-Phosphat ist in Rot hervorgehoben.



**Abbildung 36:** Struktur der TA von *S. pneumoniae*, wobei das Ribitol-5-Phosphat rot hervorgehoben ist.

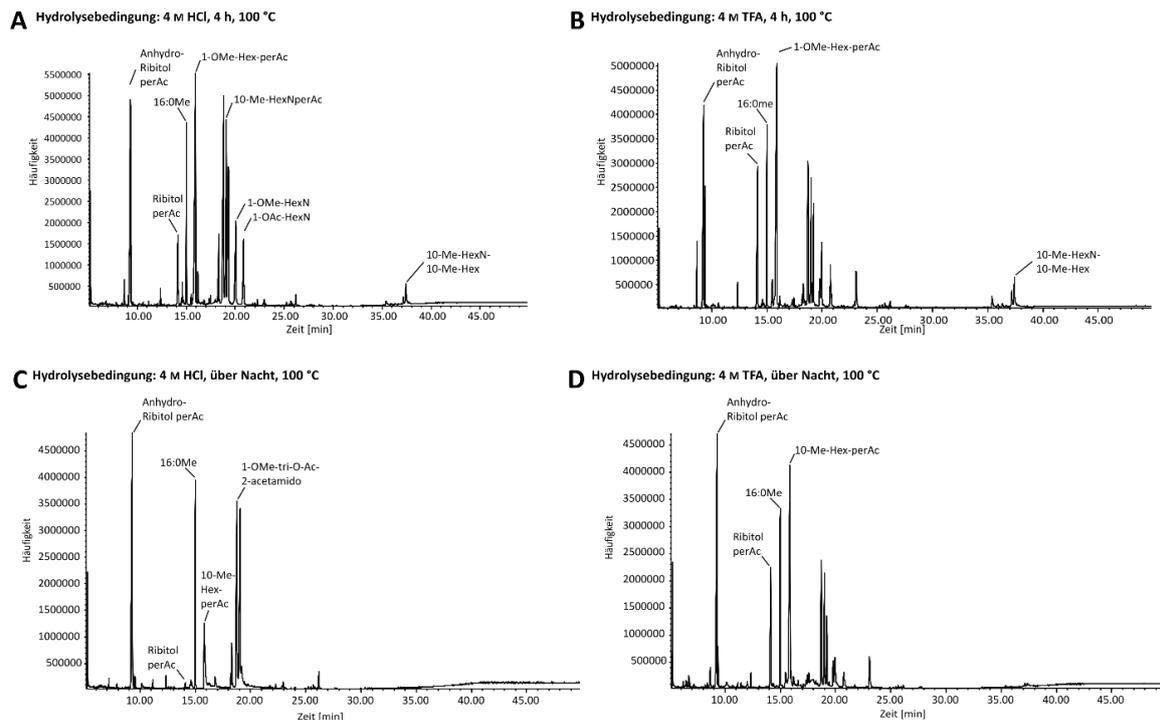
Für die Bestimmung des LTA/WTA-Verhältnisses wurde nunmehr eine Quantifizierungsmethode auf GC/MS-Basis etabliert. Die erforderliche Auftrennung der Einzelkomponenten erfolgte in diesem Fall mittels Gaschromatographie und die Detektion über ein gekoppeltes Massenspektrometer. Vorversuche mit isolierter LTA zeigten hierzu, dass Ribitol während der Hydrolyse zum Teil in 1,4-Anhydro-Ribitol hydrolysiert. Dies bedingte, dass sich für die Quantifizierung auf zwei Standardreihen, sowohl für Ribitol als auch für 1,4-Anhydro-Ribitol, bezogen werden musste. Beide Standards wurden in sieben verschiedenen Konzentrationen (500 ng/mL, 750 ng/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL und 10 µg/mL) für die Standardreihen vermessen. Dabei wurde jede Standardreihe für Ribitol und für 1,4-Anhydro-Ribitol als unabhängiges Duplikat angesetzt sowie jede Konzentration als technisches Replikat gemessen. Die verschiedenen Standard-Konzentrationen wurden mit 50 µL Pyridin und 50 µL Acetanhydrid peracetyliert und für 30 min bei 85 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Proben unter einem ständigen Wärmeeinfluss und Stickstoffstrom getrocknet (siehe **Kapitel 9.7**). Zur Entfernung des restlichen Pyridins wurde die Probe viermal mit je 100  $\mu\text{L}$  Methanol versetzt und wiederum unter Wärmeeinfluss sowie Stickstoffstrom getrocknet. !! Mehrmaliges Ansetzen der Standardreihen zeigte, dass ein zu langes Trocknen der Proben unter Stickstoffstrom zum Verflüchtigen von Ribitol und 1,4-Anhydro-Ribitol führen kann. !! Die Standards wurden in 100  $\mu\text{L}$  Chloroform gelöst und 1  $\mu\text{L}$  aus 100  $\mu\text{L}$  wurde dann injiziert. Die Methode ist detailliert in dem **Kapitel 9.7** erläutert. Ein exemplarisches GC-Chromatogramm für eine Konzentration von 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  für Ribitol und 1,4-Anhydro-Ribitol ist in **Abbildung 37 A** und **C** dargestellt. Dabei zeigt sich bei einem Vergleich der Retentionszeiten von 1,4-Anhydro-Ribitol und Ribitol, dass diese Basislinien-getrennt im GC-Chromatogramm erscheinen (siehe **Abbildung 37 A, C**). Die resultierenden Standardreihen für Ribitol (**B**) und für 1,4-Anhydro-Ribitol (**D**) sowie die jeweilige Geradengleichung sind in **Abbildung 37 B** und **D** dargestellt.



**Abbildung 37:** GC-Chromatogramm für die Konzentration von 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sowie die Standardreihe mit der Geradengleichung für 1,4-Anhydro-Ribitol (A,B) und für Ribitol (C,D). Dabei besitzt 1,4-Anhydro-Ribitol eine Retentionszeit von 9,15 min und Ribitol eine Retentionszeit von 14,12 min.

Des Weiteren wurden an isolierter LTA vier verschiedene Hydrolyse-Bedingungen bei jeweils 100  $^{\circ}\text{C}$  getestet (siehe **Abbildung 38 A** bis **D**). Die Hydrolyse wurde zum einen mit 4 M Salzsäure und zum anderen mit 4 M Trifluoressigsäure bei einer Inkubationszeit von 4 h sowie über Nacht durchgeführt. Ziel war es eine Hydrolyse-Bedingung zu finden, welche Ribitol komplett hydrolysiert bzw. Ribitol vollständig in 1,4-Anhydro-Ribitol umwandelt. Die Ergebnisse der verschiedenen Hydrolyse-Bedingungen sind in **Abbildung 38** dargestellt.



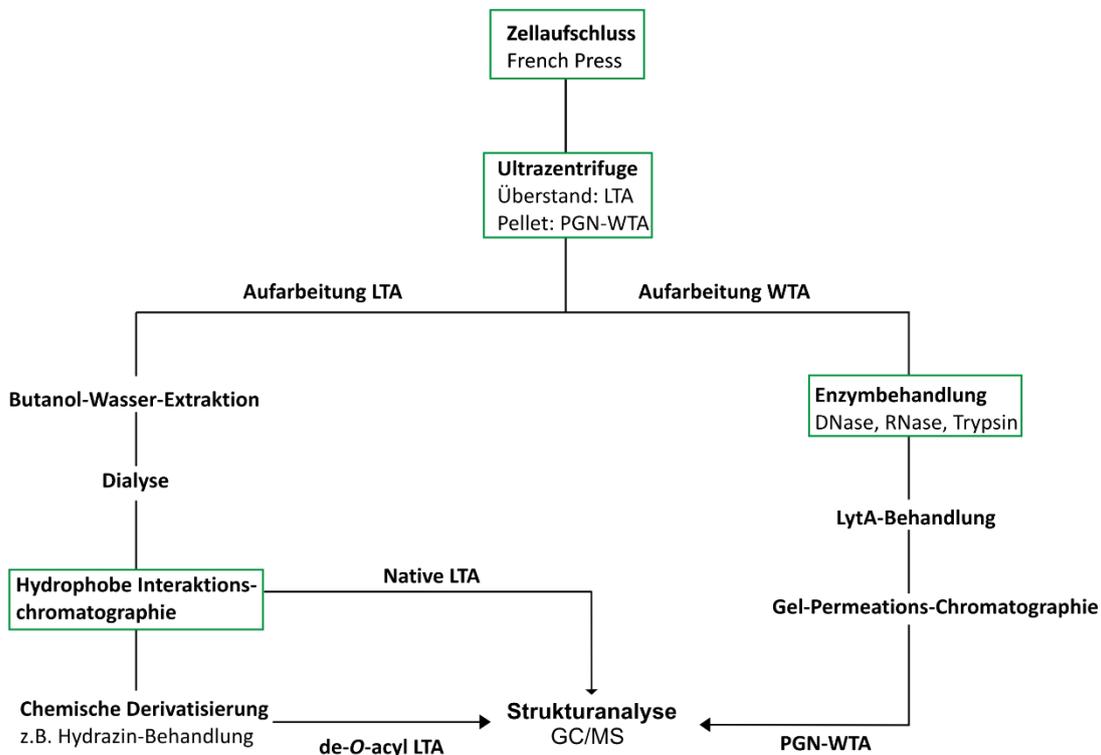
**Abbildung 38:** Vergleich der verschiedenen Hydrolyse-Bedingungen von isolierter LTA aus *S. pneumoniae* D39Δ*cps*Δ*lgt* mit Zuordnung ausgewählter Signale. GC-Chromatogramm nach Hydrolyse mit **A)** 4 M HCl für 4 h bei 100 °C, **B)** 4 M TFA für 4 h bei 100 °C, **C)** 4 M HCl über Nacht bei 100 °C, **D)** 4 M TFA über Nacht bei 100 °C.

Bei einem Vergleich der GC/MS-Chromatogramme für die verschiedenen Hydrolyse-Bedingungen zeigte sich, dass keine Hydrolyse vollständig zu Ribitol führte bzw. Ribitol vollständig in 1,4-Anhydro-Ribitol umgewandelt wurde (siehe **Abbildung 38**). Die Hydrolyse mit 4 M HCl und einer Inkubationszeit über Nacht wies zwar einen hohen Anteil an 1,4-Anhydro-Ribitol auf, jedoch konnte Ribitol noch in kleinen Mengen nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurde als nächster Anhaltspunkt das Verhältnis von Ribitol und 1,4-Anhydro-Ribitol herangezogen. Dabei zeigte sich, dass bei der Hydrolyse mit 4 M TFA und einer Inkubationszeit von 4 h, 1,4-Anhydro-Ribitol und Ribitol in einem Verhältnis und einer Intensität vorliegen, die eine verlässliche Integration der Peakflächen erlauben. Diese Hydrolyse-Bedingung (4 M TFA, 4 h, 100 °C) wurde im weiteren Verlauf an drei unabhängigen D39Δ*cps* Kulturen angewendet und das LTA zu WTA-Verhältnis ermittelt werden. Diesem Thema widmet sich das nachfolgende **Kapitel 7.1**.

## 7.1 Untersuchungen des LTA/WTA-Verhältnisses für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δ*cps*

Die Quantifizierung von LTA und WTA mittels GC/MS wurde zunächst als „proof-of-principle“ an drei unabhängigen Kulturen von *S. pneumoniae* D39Δ*cps* durchgeführt. Dafür wurden während des Aufarbeitungsprozesses von LTA und WTA an verschiedenen Aufarbeitungsstadien Proben für die Quantifizierung entnommen. Diese sind in **Abbildung 39** in einem grünen Kasten dargestellt.

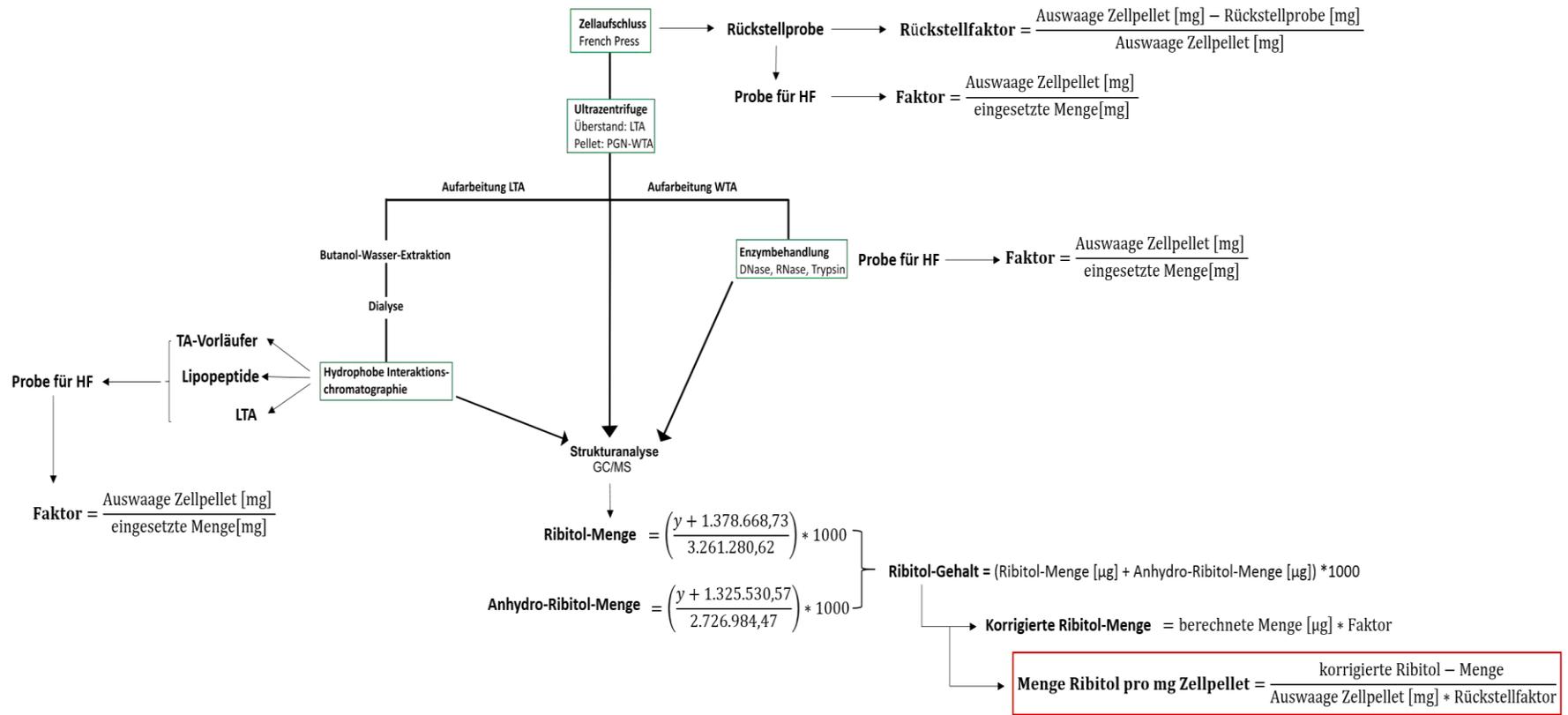
Dazu wurde bereits vor dem Zellaufschluss mit der French Press eine Rückstellprobe für die Quantifizierung entnommen, um den Gesamt-Ribitol-Gehalt für die jeweiligen Ausgangsproben zu ermitteln. Anschließend erfolgten die Trennung von LTA und WTA mittels Ultrazentrifugation und das Entfernen von SDS mit Ethanol. Von dem SDS-freien Zellmaterial wurden ebenfalls Proben für die Quantifizierung entnommen. Anschließend erfolgte, wie im **Kapitel 9.4.3** beschrieben, die Butanol-Wasser-Extraktion zur Gewinnung der LTA sowie eine hydrophobe Interaktionschromatographie. Dies gewährleistet eine chromatographische Trennung der LTA von Lipopeptiden, nicht-lipidhaltige-TA-Vorläuferketten, die aus der Hydrolyse des Und-PP-Vorläufers entstehen können, und Verunreinigungen. Von der isolierten LTA erfolgte dann mittels GC/MS die Bestimmung des Ribitol-Gehaltes für die LTA. Der PGN-WTA-Komplex wurde einer Enzymbehandlung mit DNase, RNase und Trypsin unterzogen (siehe **Kapitel 9.4.7**) und im Anschluss der Ribitol-Gehalt für die WTA ermittelt.



**Abbildung 39:** Schema für die Aufarbeitung des Zellmaterials für die Isolierung von LTA und WTA. Zu ausgewählten Zeitpunkten während der Aufarbeitung wurden Rückstellproben für die Quantifizierung entnommen, hervorgehoben mit einem grünen Kasten.

Wie im **Kapitel 7** beschrieben, erfolgte von den Proben für die Quantifizierung zunächst eine HF-Behandlung und im Anschluss die zuvor optimierte Hydrolyse mit 4 M TFA bei 100 °C für 4 h. Nach der Hydrolyse schloss sich eine Derivatisierung (Methanolyse sowie Peracetylierung, siehe **Kapitel 9.7**) der Proben an. Durch die Derivatisierung werden die Proben der Gaschromatographie zugänglich gemacht. Dabei erfolgt eine Methylierung der Hydroxygruppen der Zucker, was eine Erhöhung der Flüchtigkeit des Ribitols bedingt.

Bei der Auswertung der Standardreihen wurden zwei verschiedene Grenzbereiche (Threshold) für die Flächen getestet, zum einen der Threshold von 16 und zum anderen der Threshold von 18. Der Threshold stellt dabei die minimale Intensität der Peaks dar, die automatisch von der Software integriert werden. Aufgrund der niedrigen Intensitäten für die Konzentrationen von 500 ng/mL und 750 ng/mL erfolgte bei einem Threshold von 18 keine Integration der Peakflächen für Ribitol bzw. für 1,4-Anhydro-Ribitol. Bei einem Threshold von 16 erfolgte trotz der geringen Intensität für beide Konzentrationen eine Integration der Flächen. Daher wurde bei der Integration der Standards sowie der verschiedenen Proben der Threshold auf 16 standardisiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass eine reproduzierbare Auswertung der Spektren erfolgt und das Peakflächen mit einer niedrigen Intensität integriert werden und somit in die Berechnung einfließen. Bei der Auswertung der GC-Chromatogramme wurden umliegende Signale von 1,4-Anhydro-Ribitol und Ribitol im Massenspektrum ebenfalls überprüft. Handelte es sich dabei ebenfalls um 1,4-Anhydro-Ribitol bzw. Ribitol, wurde die Peakfläche zum Hauptpeak addiert. In der **Abbildung 40** ist die Aufarbeitung dargestellt sowie die jeweiligen Schritte an denen Rückstellproben und Proben für die anschließende HF-Behandlung entnommen wurden. Weiterhin sind an den entsprechenden Stellen die dazugehörigen Berechnungen für die Quantifizierung dargestellt. Die in der **Abbildung 40** dargestellten Gleichungen sind im **Kapitel 9.7.1** hergeleitet und erläutert. Die aufgestellten Geradengleichungen (siehe **Kapitel 9.7.1**) dienen in diesem Fall für die anschließenden Messungen. Bei erneuten GC/MS-Messungen sollten die Standardreihen erneut vermessen und die Geradengleichungen dahingehend angepasst werden.



**Abbildung 40: Aufarbeitungsschema für die TA von *S. pneumoniae*.** In grünen Kästen dargestellt sind die Zeitpunkte, an denen Proben für die Quantifizierung entnommen wurden. Weiterhin sind an den entsprechenden Stellen die jeweiligen Formeln für die Berechnung dargestellt.

Die erhaltenen Peakflächen sowie die berechneten Ribitol-Mengen pro mg Zellpellet für die drei unabhängigen D39Δ*cps* Kulturen sind detailliert in **Kapitel 12.1 bis 12.3** (siehe **Tabellen 24 bis 29**) aufgelistet. Im Durchschnitt ergab sich für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δ*cps* ein LTA-Anteil von  $18,3 \pm 2,1\%$ . Für die WTA nach Enzymbehandlung konnte im Durchschnitt ein Anteil von  $81,7 \pm 2,1\%$  ermittelt werden. Dagegen spiegelte das LTA zu WTA Verhältnis vor der Enzymbehandlung des PGN-WTA-Komplexes einen leicht höheren Anteil an WTA wieder (90%) (siehe **Tabelle 14**). Dabei stellt das LTA/WTA-Verhältnis vor der Enzymbehandlung eine aussagekräftigere Größere dar im Vergleich zum LTA/WTA-Verhältnis nach Enzymbehandlung. Dies lässt sich durch überproportional große Verluste während der Enzymbehandlung begründen und wurde in mehreren Aufarbeitungen von verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen beobachtet.

**Tabelle 14:** Vergleich des LTA zu WTA Verhältnisses vor der Enzymbehandlung und nach der Enzymbehandlung des PGN-WTA-Komplexes.

Verhältnis LTA zu WTA		Unabhängige D39Δ <i>cps</i> Kulturen		
		I	II	III
<u>Vor</u>	LTA [%]	10,9	9,0	13,8
Enzymbehandlung	WTA [%]	89,2	91,0	86,2
<u>Nach</u>	LTA [%]	16,2	17,7	21,1
Enzymbehandlung	WTA [%]	83,8	82,3	78,9

Zusätzlich konnte aus den ermittelten Daten eine Wiederfindungsrate berechnet werden. Dabei lag die Wiederfindungsrate im Mittel für die drei Kulturen bei  $41,2 \pm 6,3\%$ . Diese geringe Wiederfindungsrate kann von zwei Faktoren beeinflusst werden. Ein nicht zu vernachlässigender Faktor können TA-Vorläuferstufe aus der Biosynthese sein, wie z. B. Ribitol-Phosphat und CDP-Ribitol (siehe **Abbildung 6**). Diese fließen in den Gesamt-Ribitol-Gehalt des Zellpellets mit ein und beeinflussen somit negativ den Gesamt-Ribitol-Gehalt an dieser Stelle. Weiterhin können während des Aufarbeitungsprozesses und der Isolierung von LTA bzw. WTA Verluste auftreten. Zum anderen können weitere Verluste bei der Probenvorbereitung für die GC/MS-Messung auftreten. Die Wiederfindungsrate bzw. der Verlust während der Probenvorbereitung für die GC/MS-Messung könnte hier durch die Zugabe eines internen Standards ermittelt werden.

Das ermittelte LTA zu WTA-Verhältnis mittels der etablierten Methode von  $11,24 \pm 1,98\%$  LTA und  $88,75 \pm 1,98\%$  WTA (vor Enzymbehandlung) verifizieren sehr gut das publizierte LTA/WTA-Verhältnis für *S. pneumoniae*. Dabei lag das publizierte LTA/WTA-Verhältnis ebenfalls bei 10% LTA und 90% WTA [58].

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich eine Methode etabliert, die ohne radioaktive Markierung auskommt und damit leichter zugänglich und ungefährlicher durchzuführen ist.

Die etablierte Quantifizierungsmethode stellt somit einen hervorragenden Ansatzpunkt dar, der auf diesem Gebiet weitere Untersuchungen ermöglicht.

Aufgrund der Reproduzierbarkeit in drei unabhängigen Kulturen und der guten Übereinstimmung mit den publizierten LTA/WTA-Verhältnissen sollte im nächsten Schritt die Frage geklärt werden, ob die *TacL*-Deletion einen Einfluss auf den WTA-Gehalt besitzt. Dieser Frage soll in dem **Kapitel 7.2** nachgegangen werden.

### 7.2 Anwendung der Quantifizierungsmethode auf die *TacL*-Deletionsstämme

Für die Bestimmung des Einflusses der *TacL*-Deletion auf den WTA-Gehalt wurde an denselben Stellen der Aufarbeitung Proben entnommen (siehe **Abbildung 39**). Bereits im Vorfeld durchgeführte Durchflusszytometrie-Untersuchungen mit dem *S. pneumoniae* Wildtyp, dem *TacL*-Deletionsstamm sowie dem Komplementationsstamm mit dem TEPC-15- und dem anti-Forsman-Antikörper deuteten auf keine signifikanten Unterschiede in den TAs hin<sup>9</sup>. Dabei erkennt der TEPC-15-Antikörper spezifisch die *P*-Cho-Substituenten der TAs und der anti-Forsman-Antikörper den Terminus ( $\alpha$ -D-GalpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1→)). Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mit einer unabhängigen Methode, in diesem Fall der etablierten Quantifizierungsmethode, an dem *TacL*-Deletionsstamm sowie dem Komplementationsstamm validiert.

Die Probenvorbereitung sowie die anschließende Berechnung erfolgten wie im **Kapitel 7.1** beschrieben. Da zuvor bereits für den unbekapselten D39-Stamm das LTA/WTA Verhältnis ermittelt wurde, erfolgte die Bestimmung des Einflusses der *TacL*-Deletion lediglich an dieser Stelle für den *TacL*-Deletionsstamm und dem Komplementationsstamm von dem *S. pneumoniae* Stamm D39 $\Delta$ *cps*. Die erhaltenen Peakflächen sowie die berechneten Ribitol-Menge pro mg Zellpellet für die zwei unabhängigen D39 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *tacL*-Kulturen sowie den zwei unabhängigen D39 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *tacL* pBAV1C-*tacL*-Kulturen sind in **Kapitel 12.4 bis 12.7** (siehe **Tabellen 30 bis 37**) aufgelistet. Aufgrund der fehlenden LTA in der *TacL*-Mutante konnte zum Schluss natürlich kein Gesamt-Ribitol-Gehalt aus LTA und WTA pro mg Zellpellet ermittelt werden. Daher musste für die Bestimmung eine andere Bezugsgröße betrachtet werden. Ein Vergleich des unbekapselten Wildtyps mit Mutante und Komplementante kann anhand des Wertes für den Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet erfolgen (siehe **Tabelle 15**).

---

<sup>9</sup> Durchflusszytometrie Versuche durchgeführt von Nathalie Heß, Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland

Tabelle 15: Vergleich der Ribitol-Menge [ $\mu\text{g}$ ] pro mg Zellpellet inklusive dem Mittelwert ( $\emptyset$ ) und der Standardabweichung ( $\pm\text{SD}$ ) für LTA und WTA aus den Stämmen *D39 $\Delta$ cps*, *D39 $\Delta$ cps $\Delta$ tacl* und *D39 $\Delta$ cps $\Delta$ tacl pBAV1C-tacl*.

Ribitol-Menge [ $\mu\text{g}$ ] pro mg Zellpellet	<i>D39<math>\Delta</math>cps</i>			<i>D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl</i>		<i>D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl</i> <i>pBAV1c-tacl</i>	
LTA	0,374	0,522	0,956	/	/	0,196	0,370
$\emptyset$		0,617			/		0,283
Standardabweichung		$\pm 0,247$			/		$\pm 0,087$
PGN-WTA	1,938	2,432	3,584	2,223	2,011	1,491	2,860
$\emptyset$		2,651			2,117		2,176
Standardabweichung		$\pm 0,690$			$\pm 0,106$		$\pm 0,685$

Der Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet für den PGN-WTA-Komplex für *D39 $\Delta$ cps* liegt in einem Bereich von  $2,651 \pm 0,690 \mu\text{g}$ . Bei einer Einzelbetrachtung der drei unabhängigen Kulturen fällt auf, dass der Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet recht starken Schwankungen unterliegt. Eine Gegenüberstellung des Ribitol-Gehaltes pro mg Zellpellet für die WTA zeigte für Wildtyp (*D39 $\Delta$ cps*,  $2,651 \pm 0,690 \mu\text{g}$ ), Deletionsstamm (*D39 $\Delta$ cps $\Delta$ tacl*,  $2,117 \pm 0,106 \mu\text{g}$ ) und Komplementationsstamm (*D39 $\Delta$ cps $\Delta$ tacl pBAV1C-tacl*,  $2,176 \pm 0,685 \mu\text{g}$ ) vergleichbare Werte. Des Weiteren liegt der durchschnittliche Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet des PGN-WTA-Komplexes sowohl in dem Deletionsstamm als auch in dem Komplementationsstamm etwas niedriger. Diese Abweichung liegt jedoch noch im Bereich der Standardabweichung. Bei einem Blick auf den Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet zeigt sich im Durchschnitt für die LTA aus dem Komplementationsstamm ( $0,283 \pm 0,087 \mu\text{g}$ ) ein geringerer Gehalt im Vergleich zur LTA aus dem Wildtyp ( $0,617 \pm 0,247 \mu\text{g}$ ). Dieser Sachverhalt spiegelt die erhaltenen Ausbeuten nach der chromatographischen Trennung der LTA von Verunreinigungen mittels HIC von diesen beiden Stämmen wider. Wie das berechnete und in der Literatur angegebene Verhältnis verdeutlicht, liegt das LTA/WTA-Verhältnis auch in dem Komplementationsstamm bei ca. 10% zu 90%. Bei einem Blick auf die einzelnen Ribitol-Gehalte pro mg Zellpellet für den PGN-WTA-Komplex für *D39 $\Delta$ cps* sowie bei Betrachtung der Standardabweichung (siehe **Tabelle 15**) wird deutlich, dass eine eventuelle Kompensation der fehlenden LTA im Bereich der Standardabweichung der Methodik liegt. Wodurch auf diesem Wege keine Bewertung erfolgen kann. Weiterhin decken sich diese Resultate mit den Ergebnissen der bereits zuvor durchgeführten Durchflusszytometrie-Untersuchungen im Zusammenhang mit der *TacL*-Deletion.

Die LCP-Proteine sind für die kovalente Anknüpfung der WTA an das PGN sowie für die Anknüpfung der Kapsel verantwortlich (siehe **Kapitel 1.3**). Mit der etablierten Methode könnte anhand von verschiedenen Einzel-, Doppel-, und Dreifach-Deletionsstämmen der direkte Einfluss von LytR, CpsA und Psr auf die WTA-Anheftung bestimmt werden. Ein weiterer Ansatzpunkt für die Bestimmung des WTA-Gehaltes in diesen Deletionsstämmen stellt die Durchflusszytometrie dar. Jedoch erlaubt die Durchflusszytometrie keine direkte Bestimmung des WTA-Gehaltes, sondern lediglich die Bestimmung des Gesamt-TA-Gehaltes über spezifische TA-Antikörper (TEPC-15-, Forssmann-Antikörper). Für diesen Zweck könnte der TacL-Deletionsstamm als Basis verwendet werden, um jeweils eines der drei einzelnen LCP kodierende Gene zu deletieren. Diese Stämme könnten mittels Durchflusszytometrie analysiert werden und der Einfluss der einzelnen LCP-Proteine bestimmt werden.

## 8. Zusammenfassung

Die WHO zählt *S. pneumoniae* zu den zwölf gefährlichsten bakteriellen Krankheitserregern. Pneumokokken können bei immunsupprimierten Patienten und Kindern eine schwere Lungenentzündung bis hin zur Sepsis verursachen. Trotz vorhandener Impfstoffe ist die Zahl der Infektionen nach wie vor unverändert. Aufgrund von zunehmenden Antibiotika-Resistenzen ist die Entwicklung neuer Impfstoffe oder Antibiotika von gesellschaftlicher Relevanz. Die Zellwand von Pneumokokken stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für strukturanalytische Untersuchungen dar, um behandlungsrelevante Ansatzpunkte für Zielstrukturen zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte in einem interdisziplinären Verbundprojekt mit Prof. Dr. Sven Hammerschmidt (Universität Greifswald) eine systematische Analyse von potentiellen Schlüssel-molekülen der Pneumokokken-TA-Biosynthese. Hierbei gelang es erfolgreich TacL als das Protein zu identifizieren, das für die TA-Anheftung an den Glykolipidanker zuständig ist. Die Deletion des für das TacL kodierenden Gens führte in zwei unabhängigen Mausmodellen zu einer deutlich verminderten Virulenz. Darüber hinaus war eine abgeschwächte Adhäsion an humanen Lungenepithelzellen zu beobachten. Damit stellt das Enzym TacL eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung neuer geeigneter pharmakologischer Substanzen dar.

Über die TA-Strukturen hinaus stellen Oberflächenproteine einen entscheidenden Faktor für die Virulenz des Erregers und die Kolonisierung des Wirtes dar. Hierzu gehören Cholin-Bindeproteine, die über nicht-kovalente Bindung an *P*-Cho-Substituenten der TAs binden. Die in dieser Arbeit erstmalig etablierte Methode zur Trennung von LTA aus *S. pneumoniae* nach Kettenlänge ermöglicht nun Wechselwirkungsstudien von CBPs mit homogener LTA durchzuführen. Diese Co-Kristallisationsstudien werden bei erfolgreicher Kristallisation weitere Einblicke in den Zellwandaufbau ermöglichen. Anhand dieser Untersuchungen könnte aufgeklärt werden, ob eine minimale Kettenlänge der TA für die Wechselwirkung mit CBPs essentiell ist und wie spezifisch diese Wechselwirkung erfolgt.

Die nicht-kovalente Bindung der CBPs an den *P*-Cho-Substituenten der TA kann am  $\alpha$ - und am  $\beta$ -D-GalpNAc erfolgen. Über die spezifische *P*-Cho-Anheftung am  $\alpha$ - und am  $\beta$ -D-GalpNAc lagen zu Beginn der Arbeit lediglich bioinformatische Informationen vor. Im Rahmen der Arbeit konnte der strukturchemische Beweis für eine spezifisch Anheftung über LicD1 und LicD2 geliefert werden. Dabei katalysiert LicD1 die *P*-Cho-Substituenten am  $\alpha$ -D-GalpNAc und LicD2 die *P*-Cho-Substituenten an das  $\beta$ -D-GalpNAc.

Strukturuntersuchungen mittels NMR und MS an de-*O*-acylierter LTA aus dem *S. pneumoniae* TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce Stamm zeigten deutlich, dass die Pce *in vivo* die *P*-Cho-Substituenten an der terminalen *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit hydrolysiert.

Weiterhin zeigten *in vitro*-Experimente mit heterolog exprimierter Pce zusätzlich eine spezifische Hydrolyse der *P*-Cho-Substituenten am  $\beta$ -D-GalpNAc innerhalb der *pseudo*-Pentasaccharid-Einheit. Damit wurden entscheidende Hinweise geliefert, wie sich die Pneumokokken einer frühzeitigen Erkennung durch das Wirts-Immunsystem entziehen und damit, besonders bei immungeschwächten Patienten eine Kolonisierung begünstigen und den Krankheitsverlauf erschweren.

An zwei Cholin-unabhängigen Stämmen konnte mittels NMR und MS der strukturelle Beweis erbracht werden, dass der Austausch von *S. oralis* DNA in die *lic3*-Region von *S. pneumoniae* zu einer LTA-Struktur führt, die sowohl *S. pneumoniae* als auch *S. oralis* LTA-Strukturelemente ausweist.

Dabei zeigte sich für die LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho- folgende *pseudo*-Tetrasaccharid-Struktur:  $(\rightarrow 4)\text{-}[3,6\text{-}O\text{-di-}P\text{-Cho}]\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-Rib-ol}\text{-}(1\text{-}P\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-AATGal}\text{-}(1\rightarrow)$ . Eine zusätzliche Deletion von *LicA* im D39Cho-Stamm führte zu einer LTA, die keine *P*-Cho-Substituenten mehr aufweist. Diese Ergebnisse liefern weitere Ansatzpunkte die TA-Biosynthese vor allen in *S. oralis* weiter zu betrachten um dahingehend tiefergehende Kenntnisse zu gewinnen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, eine Quantifizierungsmethode zu etablieren, um das LTA/WTA-Verhältnis zu bestimmen. Mittels GC/MS konnte eine Methode basierend auf der Bestimmung des Gesamt-Ribitol-Gehaltes etabliert werden. Über die Quantifizierung des Gesamt-Ribitol-Gehaltes war es möglich, das LTA/WTA-Verhältnis in drei unabhängigen Kulturen als „proof-of-principle“ zu ermitteln. Das ermittelte Verhältnis spiegelt das bereits 1972 publizierte Verhältnis von 10% LTA und 90% WTA sehr gut wider. Im Fokus zukünftiger Untersuchungen soll durch Durchflusszytometrie und der etablierten Quantifizierungsmethode die semi-redundante Rolle der LCP-Proteine auf die WTA-Anheftung eingehender untersucht werden. Mit den gewonnenen Erkenntnissen wurden entscheidende Schritte der TA-Biosynthese aufgedeckt, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung geeigneter pharmakologischer Substanzen darstellen. Es ist somit in der vorliegenden Arbeit gelungen nicht nur mehrere strukturelle Beweise von wichtigen Enzymen in der TA-Biosynthese zu erbringen, sondern ebenso *in vivo* ihre detaillierte Rolle in verschiedenen Mausmodellen aufzuklären. Darüber hinaus wurden zwei Methoden etabliert, die dazu beitragen, detaillierte Einblicke in Zellwandstrukturen zu gewinnen.

## 9. Experimentalteil

### 9.1 Geräte

700 MHz NMR	BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
ESI-FT-ICR-MS	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
French Press	Constant Cell disruption system
Lyophile (Temp.bereich –80 °C)	Lyovac GT 2E FINN-AQUA
Lyophile (Temp.bereich –110°C)	Scanvac CoolSafe™ 110-4 Pro, 3450 Lyngø - Dänemark
Mettler Toledo Waage	AX26 Comparator Max. 22g
Magnetrührer	IKA® RCT basic
pH Meter	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Photometer	HeLIOSβ Unicam
Q Exactive Plus	Thermo Scientific, Bremen, Deutschland
Sorvall Zentrifuge	Rotor: SL 250T, 14500 RPM Max Rotor: SL50T, 18500 RPM Max
Tischzentrifuge	eppendorf Centrifuge 5417R
TLC Silica gel 60F <sub>254</sub>	Merck
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX SUPER RK106
Ultrazentrifuge	Sorvall WX Ultra Series Centrifuge Thermo Scientific WX Ultra 80 Rotor: Sorvall® T-865 Sorvall Super T21
Waage	Sartorius AG Göttingen

## 9.2 Chemikalien

1,4 Anhydro-Ribitol	Lot: EF221, Porphyrin System, Appen, Deutschland
Ammonium acetat (NH <sub>4</sub> OAc)	VWR Chemicals, HiPerSolv Chromanorm, Darmstadt, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bio-Gel® P30 Media	Bio-RAD, Cat. #150-4154, Fine: 45-90 µm (wet)
Bio-Gel® P10 Gel	Bio-RAD, Cat. #150-4144, Fine: 45-90 µm (wet)
1-Butanol (BuOH)	Roth RotiSolv® HPLC, Art-Nr: T178.1, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck KGaA, SupraSolv for gas chromatographie ECD & FID, 1.02432.2500, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Merck, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Darmstadt, Deutschland
Deuteriumoxid 99.95% (D <sub>2</sub> O)	deutero GmbH, Lot: B15902, Kastellbaum, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase	Roche Diagnostics; DNase I from bovine pancreas grade II; Ref. 10104159001; Lot: 11733500; Indianapolis; USA
Essigsäure, 100% (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Darmstadt, Deutschland
Ethanol rein 410 (EtOH)	Brüggemann Alcohol Heilbronn GmbH, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	J.T., Baker, Merck, (Triplex® III), 'Baker Analyzed', Darmstadt, Deutschland
Flusssäure (HF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hydrazin (N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	ICN 151279
Lithium Chloride	Merck, EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, Darmstadt, Deutschland
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, SupraSolv for gas chromatographie ECD & FID, 1.06011.2500, Darmstadt, Deutschland

Methanolische HCl	Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge NaOH, 50%	J. T. Baker, Schwerte, Deutschland
1-Propanol for UV, IR, HPLC	AppliChem ITW Reagents, 361.885.1612, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Roche, recombinant PCR Grade, 03 115 879 001, Basel, Schweiz
Pyridin	Merck, EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, 1.097828.1000, Darmstadt, Deutschland
Ribitol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Ribonuclease A Typ I-AS, from bovine pancreas, Lot: 28H7465, P.O. 1120, Steinheim, Deutschland
Roti®-Stock 20% SDS	Roth, Bio Science-Grade, ready to use, sterilfiltriert, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat >99%	Carl Roth GmbH & Co KG, ACS, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; from bovine pancreas; Lot: #070M8709V; Pcode: 1000883904, Steinheim, Deutschland
TSK-40S	Tosoh Bioscience, Column Size: 2.5 x 50 cm, Mainz, Deutschland

### 9.3 Verbrauchsmaterial

Dialyseschlauch	Roth, Spectra/ Por® 6 Dialysis Membrane; 3,5 kDa MWCO; Diameter 11,5 mm
-----------------	---

Filter	PALL; 0,45 µm GHP Acrodisc 13
Fraktionsröhrchen	Sarstedt AG & Co; 8 mL Röhrchen; 100 x 13mm; PS, Nümbrecht, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG & Co; Polystyrol/Polystyrene; 10 x 4 x 45mm; Ref. 67.742, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipette	BRAND GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
Phosphattest Tubes	13x100 mm; Borosilicate Glass; Pyrex® Lot No. 21214439; Corning, New York, USA
Stericup® Filter Unit	Merck KGaA, Pore Size Rating: 0,22 µm; Darmstadt, Germany
1,5 mL Rollrand Gläser	Macherey-Nagel GmbH & Co KG; 11,6 x 32 mm; Ref. 702 O1HP, Düren, Deutschland
5 mL Rollrand Gläser	Macherey-Nagel GmbH & Co KG; 20,5 x 38 mm; Ref. 702 04.36, Düren, Deutschland
10 mL Rollrand Gläser	Macherey-Nagel GmbH & Co KG; 20,5 x 54,5 mm; Ref. 702 05.36, Düren, Deutschland
1,5 mL Schraubglas	Macherey-Nagel GmbH & Co KG; 11,6 x 32 mm; Ref. 702004, Düren, Deutschland
0,3 mL LVI Vial	Supelco; 12x32mm; Lot: 78911, Bellefonte, Pennsylvania, USA

## 9.4 Methoden

### 9.4.1 Mutantenkonstruktion und Bakterienanzucht

Die in der vorliegenden Arbeit aufgearbeiteten *S. pneumoniae* Stämme von D39 und TIGR4 wurden von Nathalie Heß und Dr. Thomas Kohler, Universität Greifswald, mittels verschiedener Antibiotika-Resistenzkassetten konstruiert und kultiviert<sup>10</sup>. Die Cholin-unabhängigen Kulturen (D39Cho<sup>-</sup>, D39Cho<sup>-</sup>licA64) wurden von Alexander Tomasz<sup>11</sup> zur Verfügung gestellt und im Labor von Dr. Isabelle Bekerredjian-Ding<sup>12</sup> kultiviert. Der **Tabelle 16** können die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme entnommen werden.

<sup>10</sup> Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, unter Leitung Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Deutschland

<sup>11</sup> Rockefeller University, New York, USA

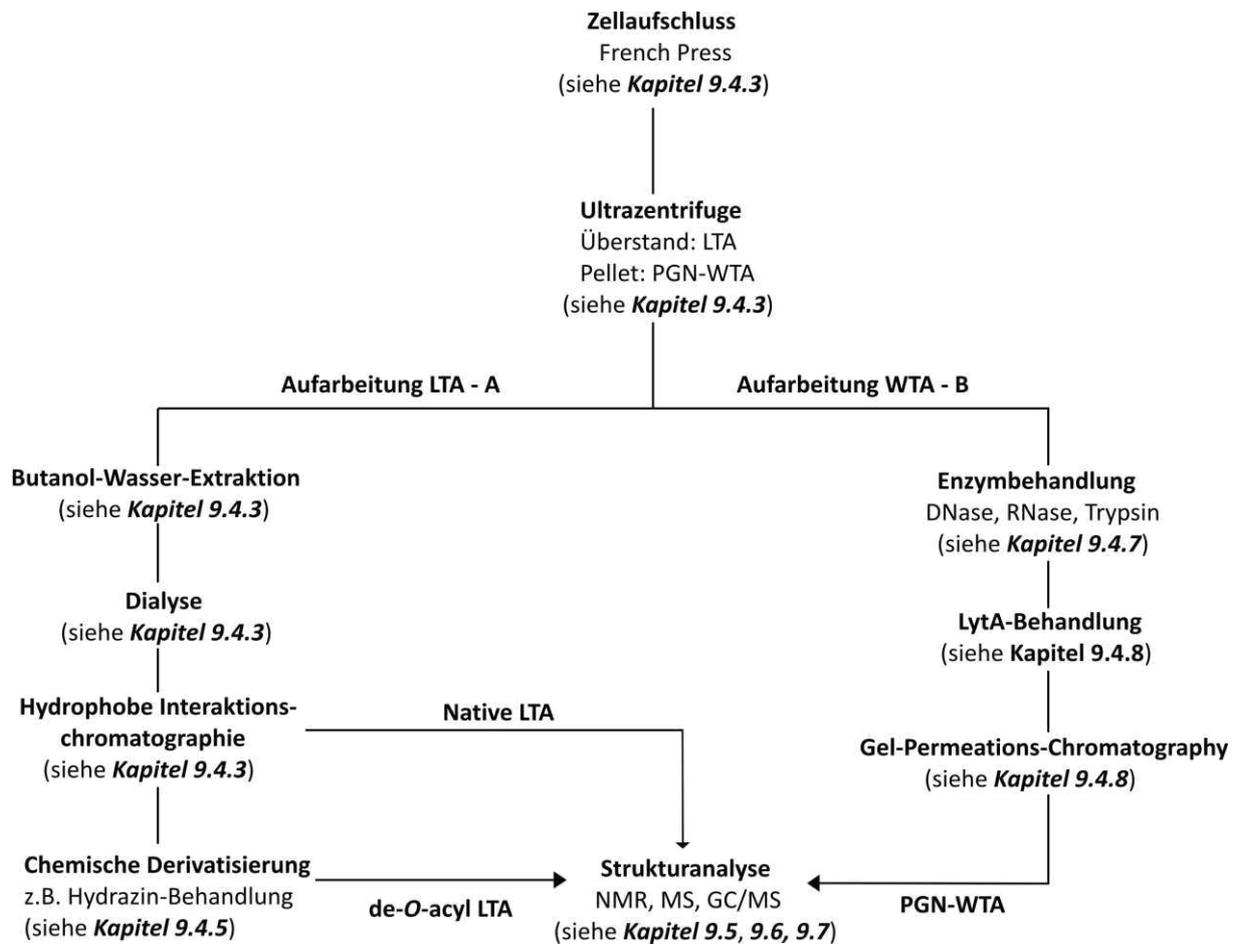
<sup>12</sup> Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland

Tabelle 16: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. pneumoniae* Stämme.

Serotyp	Stamm	Genotyp	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
2	D39	WT	/	10
		$\Delta cps$	Kanamycin	10
		$\Delta cps\Delta lgt$		10
		$\Delta cps\Delta spd_{1672}::ermB$	Kanamycin, Erythromycin	10
		$\Delta cps\Delta spd_{1672}::ermB$ pBAV1Cspd_1672	Kanamycin, Erythromycin Chloramphenicol	10
		Cho <sup>-</sup>		11,12
		Cho <sup>-</sup> licA64		11,12
		4	TIGR4	$\Delta cps$
$\Delta cps\Delta sp_{1893}::ermB$	Kanamycin, Erythromycin			10
$\Delta cps\Delta sp_{1893}::ermB$ pBAV1Csp_1893	Kanamycin, Erythromycin Chloramphenicol			10
$\Delta cps\Delta pce$	Kanamycin Erythromycin			10
$\Delta cps\Delta licD2$	Kanamycin Erythromycin			10
$\Delta cps\Delta pce\Delta licD2$	Kanamycin Erythromycin Chloramphenicol			10

#### 9.4.2 Aufarbeitung LTA und WTA

Die **Abbildung 41** repräsentiert die Aufarbeitung des Zellmaterials mit French Press sowie die anschließende Isolierung von LTA und WTA.



**Abbildung 41:** Aufarbeitungsschema für LTA und WTA, inklusive der Kapitel für die einzelnen Aufarbeitungsprozesse. Extraktion und Isolierung von der LTA ist im linken Schema (Aufarbeitung LTA) dargestellt. Die Aufarbeitung des PGN-WTA Komplexes ist im rechten Schema verdeutlicht (Aufarbeitung WTA).

Dem **Kapitel 11** ist eine Liste der verwendeten Stämme sowie die dazugehörigen Auswaagen der LTA und der PGN-WTA-Komplexe zu entnehmen.

### 9.4.3 Extraktion und Isolierung der LTA

Das Zellmaterial wurde in einer Konzentration von 1 g/50 mL in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,7) gelöst und die Lösung dreimal mit der French Press aufgeschlossen (10 °C, 20 KPSI). Dem aufgeschlossenen Zellmaterial wurde 4% SDS-Lösung hinzugefügt und die Lösung für 30 min unter Rühren erhitzt (ca. 100 °C). Das Hinzufügen von SDS ermöglichte im Anschluss die effiziente Trennung der LTA von dem PGN-WTA-Komplex durch einen Ultrazentrifugationsschritt (Ultrazentrifuge, Rotor T865, 15 min, 4 °C, 30.000 × g) an. Der resultierende Überstand (A) konnte vom entstandenen Pellet (B) abdekantiert werden (siehe **Abbildung 41**). Dabei befindet sich im Überstand die LTA und im Pellet die WTA. Die Komponenten **A** und **B** wurden anschließend lyophilisiert (Lyophile Temp.bereich -110 °C). Mittels mehrmaligen Wasch- und Zentrifugationsschritten (Sorvall Zentrifuge, Rotor SL250T, 15 min, 20 °C, 10650 × g) mit Ethanol (reinst) konnte das zuvor hinzugefügte SDS entfernt werden.

Nach dem vierten Zentrifugationsschritt wurden die jeweiligen Überstände mittels Dünnschichtchromatographie auf SDS geprüft. Wurde an dieser Stelle noch SDS nachgewiesen, schlossen sich weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit Ethanol (reinst) an. Das SDS-freie Zellmaterial wurde dann erneut lyophilisiert (Lyophile Temp.bereich  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Für die Extraktion und Isolierung der LTA erfolgte dann von dem Lyophilisat A eine Butanol-Wasser-Extraktion. Dafür wurde das Lyophilisat mit 150 mL 0,1 M Citratpuffer (pH 4,7) und 150 mL 1-Butanol versetzt, bei Raumtemperatur für 30 min gerührt und anschließend zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor SL250T, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4000 \times g$ ). Die resultierenden wässrigen Phasen wurden abdekantiert und vereint. Die Interphase sowie die organische Phase wurden erneut mit knapp 150 mL 0.1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt, für 30 min gerührt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Aufarbeitung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die lyophilisierten, wässrigen Phasen (Lyophile Temp.bereich  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde dann in MP- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und gegen 10 L 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4,7) dialysiert, wobei viermal nach je 24 h ein Pufferwechsel erfolgte. Nach dem vierten Pufferwechsel wurden die Proben für weitere 24 h dialysiert und im Anschluss das Innendialysat lyophilisiert (Lyophile Temp.bereich  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Das Lyophilisat wurde im weiteren Verlauf soweit möglich in 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4,7) plus 15% 1-Propanol gelöst, zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R,  $13.000 \times g$ , 5 min, RT) und die resultierenden Überstände in vorgewogene Rollrandgläser überführt. Die Prozedur wurde weitere zweimal wiederholt und die vereinten Überstände lyophilisiert. Mit Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) wurde anschließend die LTA von Verunreinigungen befreit.

### *Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)*

<i>Software:</i>	UniPoint Version 3.3
<i>Pumpe:</i>	Pumpe A: Gilson 305 Pumpe Pumpe B: Gilson 306 Pumpe
<i>Detektion:</i>	UV-VIS-15
<i>Fraktionssammler:</i>	Fraction Collector FC203B
<i>Mischkammer:</i>	Gilson® Dynamic Mixer 811D
<i>Säule:</i>	HiPrep™ Octyl FF 16/10, GE Healthcare
<i>Lösungsmittel:</i>	Laufmittel A: 50 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ + 15% 1-Propanol Laufmittel B: 50 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ + 60% 1-Propanol

*Methode:*

*Methode I:* Von 0 bis 40 min 0% Laufmittel B, von 40 bis 120 min linear Gradient bis auf 100% Laufmittel B, isokratischer Schritt von 120 bis 150 min mit 100% Laufmittel B, von 150 bis 180 min linearer Gradient bis auf 0% Laufmittel B, isokratische Schritt von 180 bis 240 min mit 0% Laufmittel B, Flussrate : 1 mL/min, UV-Detektion: 254 nm.

Die LTA enthaltenen Fraktionen (#20-40) wurden mittels Phosphattest getestet, die entsprechenden Fraktionen vereint, bis zur Gewichtskonstanz mit MP-H<sub>2</sub>O versetzt und lyophilisiert (Lyophile Temp.bereich -110 °C). Die **Abbildung 42** zeigt ein repräsentativen HIC-Chromatogramm sowie den dazugehörigen normierten Phosphat-Gehalt.

Für die Bestimmung der phosphat-enthaltenden Fraktionen wurden 100 µL der Fraktionen entnommen und getrocknet. Die getrockneten Proben wurden dann mit dem Aufschlußreagenz (Zusammensetzung siehe **Tabelle 17**) versetzt und 1 h bei 100 °C aufgeschlossen. Die Temperatur wurde für weitere zwei Stunden auf 165 °C erhöht. Im Anschluss erfolgte ein abkühlen auf Raumtemperatur. Die Lösung wurde dann mit 1 mL Reagenz C (Zusammensetzung siehe **Tabelle 17**) versetzt und in einem 37 °C Wasserbad für 90 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 820 nm.

**Tabelle 17:** Zusammensetzung der Lösungsmittel für die Bestimmung des Phosphatgehaltes.

Lösung		Volumen [mL]
<b>Aufschlussreagenz</b>	Wasser H <sub>2</sub> O	62,7
	Konz. Schwefelsäure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30,6
	70% Perchlorsäure HClO <sub>4</sub>	5,7
<b>Reagenz A</b>	1 M Na-Acetatlösung	1
	2,5% Ammoniummolybdatlösung	1
	Wasser H <sub>2</sub> O	7
<b>Reagenz B</b>	10% Ascorbinsäure	
<b>Reagenz C</b>	Reagenz A	9
	Reagenz B	1

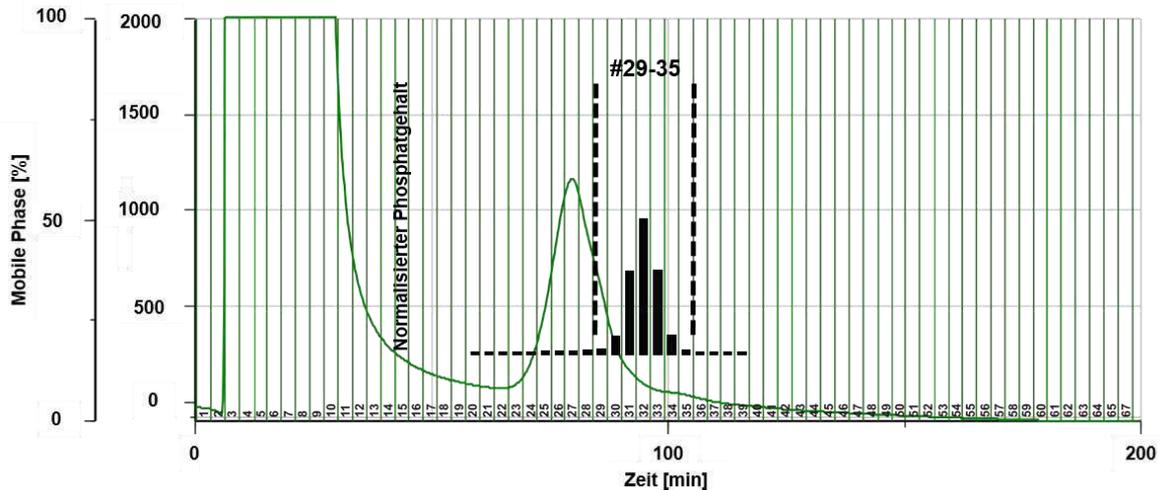


Abbildung 42: Exemplarisches HIC-Chromatogramm inklusive dem dazugehörigen normierten Phosphattest für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps für die Fraktionen #20-40.

#### 9.4.4 Fluorwasserstoff-Behandlung

Die Proben wurden mit 50 µL Fluorwasserstoff versetzt und die Lösung für 72 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Um die HF-Behandlung zu stoppen, wurde dann 100 µL MP-H<sub>2</sub>O auf die Proben gegeben und die Lösung langsam unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die trockenen Proben wurden weitere zweimal mit 300 µL MP-H<sub>2</sub>O versetzt und erneut unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben dreimal in 500 µL-Schritten in 1,5 mL Rollrandgläser überführt und erneut im Stickstoffstrom getrocknet. Aufgrund der schwach sauren Eigenschaften der HF muss bei der Behandlung darauf geachtet werden nicht in Silikatglas zu arbeiten, da dieses angeätzt werden würde.

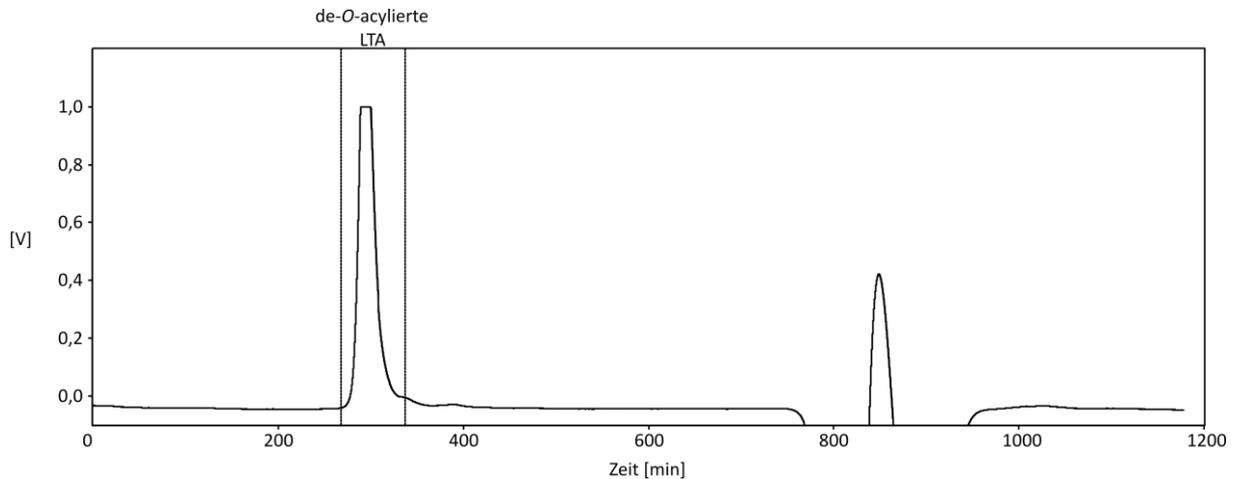
#### 9.4.5 Hydrazin-Behandlung von LTA

Für die Hydrazinolyse wurden die Proben in einer Konzentration von 5 µg/µL in Hydrazin gelöst und die Lösung für 1 h bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit einer äquivalenten Menge Aceton gestoppt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die trockene Probe wurden weitere zweimal in äquivalenter Menge Aceton resuspendiert und erneut im Stickstoffstrom getrocknet. Zum Schluss wurde die trockene Probe in 500 µL MP-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mittels Gel-Permeation-Chromatographie (GPC) gereinigt. **Abbildung 43** zeigt ein repräsentatives GPC P10 Chromatogramm inklusive der vereinten Fraktionen für die de-O-acylierte LTA.

Säule: Bio-Gel® P10 Gel

Detektor GPC: Knauer Advanced Scientific instruments RI Detector 2300

Fraktionssammler GPC:	Gilson® FC 203B, Fraction Collection
Pumpe GPC:	Minipuls 3 Gilson®, 2 Kanal-Pumpe
Software:	Clarity
Lösungsmittel:	50 mM NH <sub>4</sub> OAc (pH-Wert 4,7)



**Abbildung 43:** Beispielhaftes Chromatogramm für die P10 für die Trennung von de-O-acylierte LTA von Salzen nach Hydrazin-Behandlung. Die Abbildung zeigt das Chromatogramm für die LTA von den *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cpsΔpce*.

Die de-O-acylierte LTA enthaltenen Fraktionen (siehe **Abbildung 43**), meist zwischen den Fraktionen 17-21, wurden vereint und lyophilisiert (Lyophile Temp.bereich –110 °C).

#### 9.4.6 *In vitro*-Behandlung von LTA mit Phosphorylcholin Esterase

Die *in vitro*-Behandlung von LTA mit Phosphorylcholine Esterase (Pce) erfolgte in abgewandelter Form nach dem Protokoll von [69]. Dafür wurde isolierte LTA aus *S. pneumoniae* TIGR4Δ*cpsΔpce* in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4 bzw. 8,0) gelöst und heterolog exprimierte Pce in verschiedenen Konzentrationen (80 µg Pce/mg isolierte LTA vs. 160 µg/mg vs. 240 µg/mg) hinzugefügt. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von 37 °C für 24 h unter Rühren inkubiert. Um das Enzym zu deaktivieren und die Reaktion zu stoppen, erfolgte im Anschluss eine Erhöhung der Temperatur auf 100 °C für 5 min. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge 5417R, 4 °C, 20 min, 10.000 × *g*) und der entstandene Überstand wurde in ein vorgewogenes Rollrandglas überführt und anschließend lyophilisiert. Es folgte eine Hydrazinolyse von dem Lyophilisat wie in **Kapitel 9.4.5.** beschrieben.

## 9.4.7 Extraktion und Isolierung von PGN-WTA

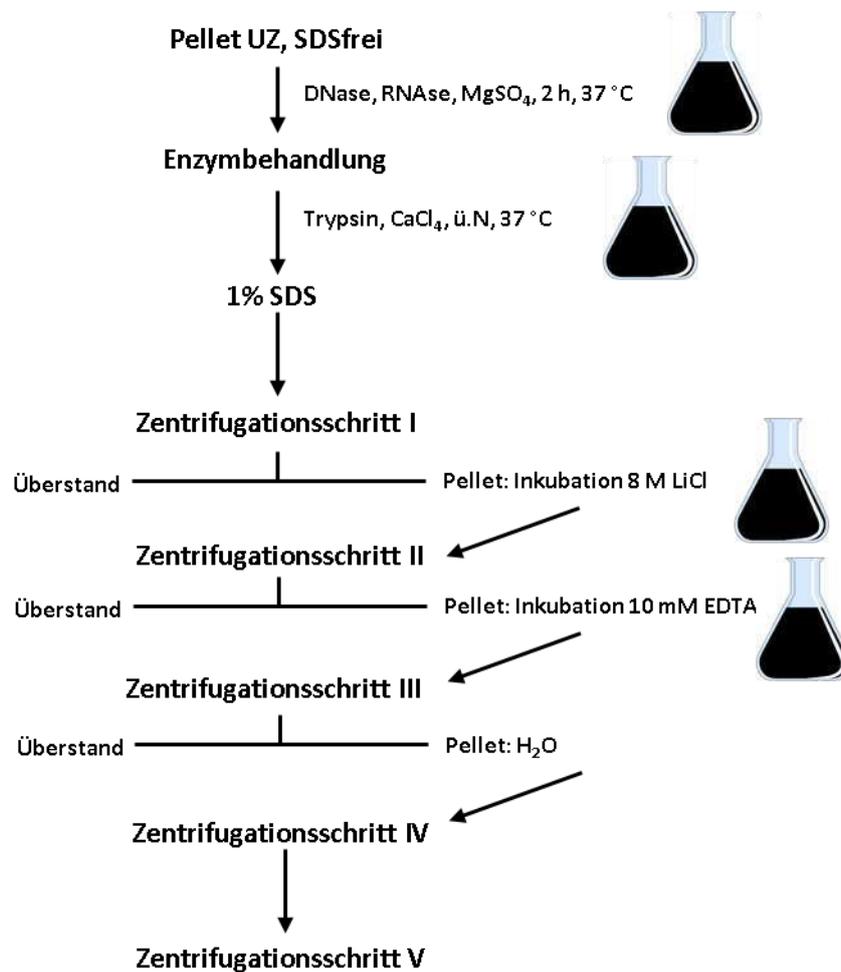


Abbildung 44: Isolierung des PGN-WTA-Komplexes mit den Enzym-Zugaben, den verschiedenen Inkubations- und Zentrifugationsschritten. Aufarbeitung verändert nach [18].

Die WTA Aufarbeitung erfolgte in abgewandelter Form wie beschrieben in [18], siehe **Abbildung 44**. Das SDS-freie Pellet nach Ultrazentrifuge (siehe **Abbildung 41**) wurde in einer Konzentration von 10 mg/mL in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert. Zur Lösung wurden in einer Konzentration von 10 µg/mL DNase A, 50 µg/mL RNase I sowie 20 mM MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt und für 2 h bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 10 mM CaCl<sub>2</sub> und Trypsin in einer Konzentration von 100 µg/mL. Nach der Zugabe wurde die Lösung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Enzym-Aktivität zu deaktivieren, wurde am nächsten Tag SDS in einer Konzentration von 1% hinzugefügt und für 15 min bei 80 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei einer Temperatur von 25 °C für 45 min bei 130.000 × g pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 0,8 mL 8 M LiCl pro 1 mL initial eingesetzter Tris-HCl Lösung resuspendiert und die Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt unter den genannten Bedingungen

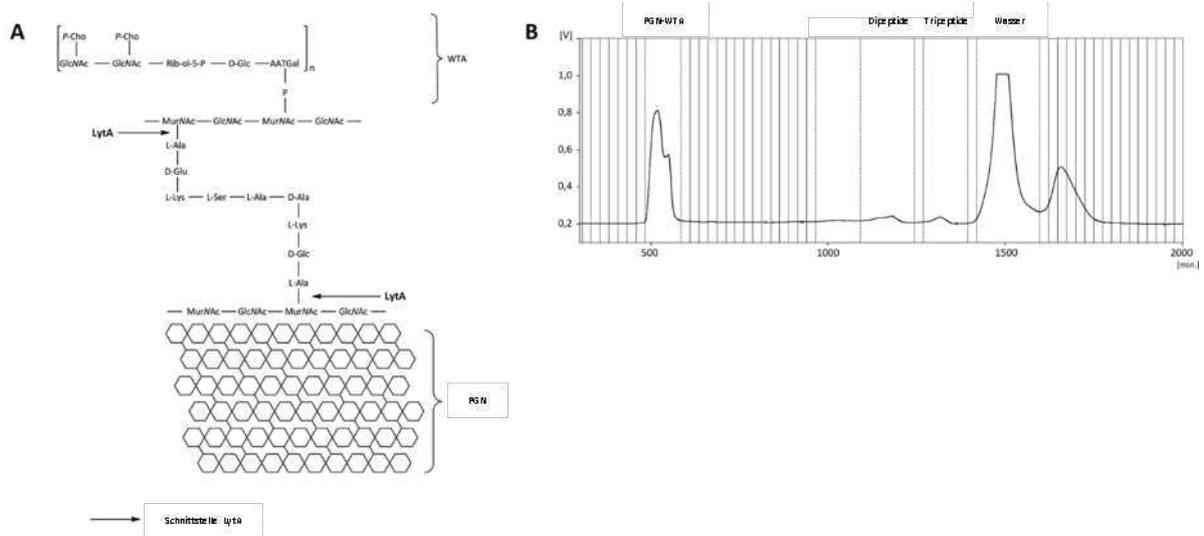
(45 min,  $130.000 \times g$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Der entstandene Überstand wurde abdekantiert und das resultierende Pellet in 1 mL 10 mM EDTA Lösung (pH 7,0) initial eingesetzter Tris-HCl Lösung resuspendiert, für 15 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Aufgrund von häufig auftretenden höheren Verluste bei den sich anschließenden Waschschritten, wurde an dieser Stelle vom ursprünglichen Protokoll abgewichen. Das entstandene Pellet wurde in MP-H<sub>2</sub>O gelöst und unter den genannten Bedingungen ( $45 \text{ min}$ ,  $130.000 \times g$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert. Der letzte Aufarbeitungsschritt wurde anschließend nochmals wiederholt (siehe **Abbildung 44**).

#### 9.4.8 Enzymverdau mit LytA

Der PGN-WTA-Komplex wurde für verschiedene Fragestellungen LytA behandelt. Hierbei handelt es sich um eine *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, die die Verknüpfung von der MurNAc zum Alanin hydrolysiert (siehe **Abbildung 45 A**). Dafür wurde der isolierte PGN-WTA-Komplex von **Kapitel 9.4.7** in einer Konzentration von 10 mg/mL in Tris-HCl (pH 7,0) resuspendiert, LytA hinzugefügt und die Lösung unter Rühren bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zugabe von LytA erfolgte in einer Konzentration 10 µg LytA je 1 mg Probe und zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h. Nach der letzten Zugabe wurde die Lösung für weitere 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gerührt und inkubiert. Während der LytA-Behandlung wurde darauf geachtet, dass eine Sauerstoffversorgung der Lösung gewährleistet ist. Dies wurde durch eine Kanüle erreicht. Um die Aktivität von LytA zu deaktivieren, wurde die Lösung nach 72 h für 5 min in einem  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  Wasserbad unter Rühren inkubiert und anschließend für 15 min bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $25.000 \times g$  zentrifugiert. Der entstandene Überstand sowie das entstandene Pellet wurde in vorgewogene Rollrandgläser überführt.

Die WTA, geknüpft an GlcNAc-MurNAc-Ketten, wurde mittels GPC P30-Säule von dem PGN entstandenen Dipeptide sowie Tripeptide getrennt. Für die chromatographische Trennung der WTA von anderen Zellwandbestandteilen mittels GPC wurde das Lyophilisat in 1 mL MP-H<sub>2</sub>O auf die Säule aufgetragen (siehe **Abbildung 45 B**).

<i>Säule:</i>	Bio-Gel® P30 Gel
<i>Detektor GPC:</i>	Knauer Advanced Scientific instruments RI Detector 2300
<i>Fraktionssammler GPC:</i>	Gilson® FC 203B, Fraction Collection
<i>Pumpe GPC:</i>	Minipuls 3 Gilson®, 2 Kanal-Pumpe
<i>Software:</i>	Clarity
<i>Lösungsmittel:</i>	50 mM NH <sub>4</sub> OAc (pH-Wert 4,7)



**Abbildung 45: Hydrolyse der PGN-WTA-Schicht durch LytA sowie die anschließend Trennung mittels GPC P30-Säule mit den vereinten Fraktionen für den PGN-WTA-Komplex, den Tripeptiden und Dipeptiden aus der PGN-Schicht. (A)** Abbildung A zeigt die Hydrolyse der LytA zwischen MurNAc und Alanin der Peptidoglykanschicht, dargestellt durch einen schwarzen Pfeil. Zusätzlich ist die Anbindung der WTA über ein Phosphat an MurNAc dargestellt. **(B)** Trennung mittels P30 des PGN-WTA-Komplexes von *S. pneumoniae* D39ΔcpsΔlgt mit der P30 nach der LytA-Behandlung. MurNAc – N-Acetyl- muraminsäure, GlcNAc – N-Acetyl- glukosaminsäure, PGN – Peptidoglykan.

## 9.4.9 Chromatographische Trennung von Teichonsäuren nach Kettenlänge

### 9.4.9.1 Trennung der LTA nach Kettenlänge mit der Reversed Phase (RP)-18-HPLC

Die Trennung der LTA nach Kettenlänge mit der Reversed-Phase (RP) Chromatographie beruht auf unterschiedliche hydrophobe Eigenschaften innerhalb der Proben. Basierend auf der Methode von [79] erfolgte die Trennung mit der RP-18-HPLC.

<b>Software:</b>	Gilson HPLC Chemstation (Trilution LC, version 2.1)
<b>Pumpe:</b>	Pumpe A 305 Gilson Pumpe B 306 Gilson
<b>Detektion:</b>	Lichtstreudektor (engl. <u>E</u> vaporative <u>l</u> ight – <u>s</u> cattering <u>d</u> etector; ELSD) SEDEX 85 SEDERE LT-ELSD
<b>Säule:</b>	Semipräparative Kromasil C18 Säule (5 μm, 100 Å, 10 x 250 mm, MZ-Analysentechnik)
<b>Fraktionssammler:</b>	FC204 Fraction Collector Gilson
<b>Lösungsmittel:</b>	Laufmittel A: MeOH:CHCl <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O (57:12:31, v/v/v) + 10 mM NH <sub>4</sub> OAc Laufmittel B: MeOH:CHCl <sub>3</sub> ; (29,8:70,2; v/v/v) + 50 mM NH <sub>4</sub> OAc

*Methoden:*

*Methode I:* Das initiales System lief von 0 bis 20 min mit 2% Laufmittel B. Im Anschluss erfolgte in drei Schritten ein linearer Gradient mit 2 bis 17 % Laufmittel B von 20 bis 50 min, 17 bis 27% Laufmittel B von 50 bis 85 min, 27 bis 100% Laufmittel B von 85 bis 165 min. 100% Laufmittel B wurden für 12 min gehalten. Von 177 bis 187 min wurde das System auf 0% Laufmittel B reduziert und für weitere 10 min gehalten.

*Methode II:* Das initiales System lief von 0 bis 60 min mit 0% Laufmittel B. Es folgte ein isokratischer Schritt mit 2% Laufmittel B von 60 bis 90 min, von 60 bis 169 min auf 100% Laufmittel B erhöht. 100% Laufmittel B wurde für 12 min gehalten. Im Anschluss wurde innerhalb 1 min auf 0% Laufmittel B reduziert und für 20 min gehalten.

Die Trennung der LTA nach Kettenlänge mittels RP-18-Phase Chromatographie erfolgte mit einer semipräparativen Kromasil C18 Säule. Für die Detektion wurde ein Lichtstredetektor verwendet, wobei die Proben mit N<sub>2</sub>-Inertgas zerstäubt wurden. Die zu trennende Probe wurde dabei in Laufmittel A gelöst und injiziert.

#### 9.4.9.2 Chromatographische Trennung der LTA nach Kettenlänge mit der Anionen-Austausch-Chromatographie mit gepulster Detektion

Das Prinzip der Anionen-Austausch-Chromatographie mit gepulster Detektion (engl. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)) beruht auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der geladenen Säulenmatrix und den entgegengesetzt geladenen Bereichen der Probe. Diese können durch eine steigende Ionenkonzentration im Puffer aufgehoben werden, was folglich zur Elution der Probe führt.

Analytisches System

<i>Software:</i>	Chromeleon 6.80 SR13 Build 3967
<i>Autosampler:</i>	AS50 Dionex
<i>Pumpe:</i>	GP50
<i>Nachsäulenadditionspumpe:</i>	AXP-MS
<i>Detektion:</i>	ED40 Electrochemical Detektor Dionex
<i>Analytische Säule:</i>	CarboPac PA100, 4 x 250 mm Dionex
<i>Säulenofen:</i>	LC20 Chromatographie Enclosure Dionex (untempertiert)

Semipräparatives System

Software:	Chromeleon 6.80 SR13 Build 3967	
Detektion:	ED50	
Säulenofen:	LC20 Chromatographie Enclosure Dionex (untemperiert) mit Rheodyn 9010 Säulenschaltventil	
Semipräparative Säule:	PA1, 9 x 250 mm	
Lösungsmittel:	neutrales System:	Laufmittel A: H <sub>2</sub> O
		Laufmittel B: 1 M NaAc
	alkalisches System:	Laufmittel A: 0,1 M NaOH
		Laufmittel B: 1 M NaAc + 0,1 M NaOH

Methoden:

*Methode I:* Im neutralen System wurde ein linearer Gradient verwendet. Von 0 bis 0,5 min mit 1% Laufmittel B, von 0,5 bis 60 min linearer Gradient auf 100% Laufmittel B, isokratischer Schritt bei 100% Laufmittel B für 10 min, von 70,1 bis 83 min auf 1% Laufmittel B, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode II:* Im alkalischen System wurde ein linearer Gradient verwendet. Von 0 bis 0,5 min mit 1% Laufmittel B, von 0,5 bis 60 min linearer Gradient auf 100% Laufmittel B, isokratischer Schritt bei 100% Laufmittel B für 10 min, von 70,1 bis 83 min auf 1% Laufmittel B, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode III:* Von 0 bis 5 min mit 1% Laufmittel B, von 5 bis 11 min auf 11% Laufmittel B, von 11 bis 35 min auf 20% Laufmittel B, von 35 bis 45 min auf 100% Laufmittel B, 100% Laufmittel B wurde für 5 min gehalten, von 50 bis 50,1 min auf 1% Laufmittel B, von 50,1 bis 55 min bei 1% Laufmittel B gehalten, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode IV:* Von 0 bis 5 min mit 1% Laufmittel B, von 5 bis 11 min auf 11% Laufmittel B, isokratischer Schritt bei 11% Laufmittel B von 11 bis 20 min, von 20 bis 35 min auf 20% Laufmittel B, von 35 bis 45 min auf 100% Laufmittel B, 100% Laufmittel B wurde für 5 min gehalten, von 50 bis 50,1 min auf 1% Laufmittel B, von 50,1 bis 55 min bei 1% Laufmittel B gehalten, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode V:* Von 0 bis 5 min mit 1% Laufmittel B, von 5 bis 12 min auf 3% Laufmittel B, isokratischer Schritt bei 3% Laufmittel B von 12 bis 19 min, von 19 bis 26 min auf 7% Laufmittel B, isokratischer Schritt bei 7% Laufmittel B von 26 bis 33 min, von 33 bis 40 min auf 11% Laufmittel B, von 40 bis 45 min auf 20% Laufmittel B, von 45 bis 55 min auf 100% Laufmittel B, 100% Laufmittel B wurde für

5 min gehalten, von 60 bis 60,1 min auf 1% Laufmittel B, von 60,1 bis 55 min bei 1% Laufmittel B gehalten, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode VI:* Von 0 bis 5 min mit 1% Laufmittel B, von 5 bis 15 min auf 5% Laufmittel B, von 15 bis 25 min auf 8% Laufmittel B, von 25 bis 35 min auf 11% Laufmittel B, von 35 bis 65 min auf 32% Laufmittel B, von 65 bis 75 min auf 100% Laufmittel B, 100% Laufmittel B wurde in einem isokratischen Schritt für 5 min gehalten, von 80 bis 80,1 min auf 1% Laufmittel B, Flussrate: 1 mL/min.

*Methode VII:* Von 0 bis 5 min mit 1% Laufmittel B, von 5 bis 15 min auf 15% Laufmittel B, von 15 bis 40 min auf 11% Laufmittel B, von 40 bis 80 min auf 28% Laufmittel B, von 80 bis 90 min auf 100% Laufmittel B, 100% Laufmittel B wurden in einem isokratischen Schritt für 5 min gehalten, von 95 bis 95,1 min auf 1% Laufmittel B, bis 100 min bei 1% Laufmittel B gehalten; Flussrate: 1 mL/min.

Führte die Injektion von größeren Volumina zu keiner vollständigen Basislinien-Trennung im semi-präparativen System, wurde mit Hilfe von Einzelinjektionen im analytischen System von verschiedenen Fraktionen eine genaue Zuordnung des Signalanfanges und –endes ermöglicht.

#### 9.4.9.3 Entsalzen der Fraktionen mittels GPC

Das Lyophilisat wurde in 500 µL MP-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mittels GPC von enthaltenen Salzbestandteilen befreit.

<i>Säule:</i>	Bio-Gel® P10 Gel
<i>Detektor GPC:</i>	Knauer Advanced Scientific instruments RI Detector 2300
<i>Fraktionssammler GPC:</i>	Gilson® FC 203B, Fraction Collection
<i>Pumpe GPC:</i>	Minipuls 3 Gilson®, 2 Kanal-Pumpe
<i>Software:</i>	Clarity
<i>Lösungsmittel:</i>	50 mM NH <sub>4</sub> OAc (pH-Wert 4,7)

#### 9.4.9.4 Entsalzen der Fraktionen mittels Dialyse

Da die verwendeten Dialyseschläuche eine pH-Wert Toleranz von pH-Wert 2 bis 12 besitzen, die Fraktionen jedoch auf Grund des Laufmittels einen pH-Wert von 14 aufwiesen, musste zuvor mit wenigen µL 100% Essigsäure der pH-Wert eingestellt werden. Anschließend wurden die Fraktionen für eine Woche gegen 10 L MP-H<sub>2</sub>O dialysiert, der Wasserwechsel erfolgte hierbei tagsüber alle zwei bis drei h.

## 9.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen erfolgten an einem 700 MHz Spektrometer von der Firma BrukerBioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland) mit einem inversen 5 mm Quadrupol Resonanz-Kryoprobekopf. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mittels Topspin 3.0/3.1 von der Firma BrukerBioSpin (Rheinstetten, Deutschland). Für die externe Kalibrierung der  $^1\text{H}$ -NMR ( $\delta_{\text{H}} = 2,225$  ppm bei 300 K) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren ( $\delta_{\text{C}} = 30,89$  ppm bei 300 K) diente Aceton. Die Signale im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum wurden extern auf 85% Phosphorsäure in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{P}} = 0,0$  ppm bei 300 K) referenziert. Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Signale erfolgte mittels 2 D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY sowie TOCSY Experimente. Basierend auf den  $^1\text{H}$ -Signalen erfolgte die  $^{13}\text{C}$ -Signal-Zuordnung mittels 2 D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Experimente. Die Zuordnung weiterer  $^{13}\text{C}$ -Signale sowie die Verknüpfungen innerhalb der Teichonsäuren wurden mittels 2 D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY Experimente ermittelt.

NMR Auswerte Programm: TopSpin 3.2

## 9.6 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Masse erfolgte zum einen an einem Electrospray Ionization Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI-FT-ICR-MS) an einem 7 Tesla APEX Qe Instrument und zum anderen an einem Q Exactive Plus Gerät. An beiden Geräten wurden die Messungen im negativen Ionen Modus vermessen.

### 9.6.1 Elektrospray Ionisation Fourier-Transformation Ionenzyklotron Resonanz Massenspektrometrie

<i>Massenspektrometer:</i>	High resolution 7 Tesla hybrid Qq/ FT-ICR-MS
<i>Ionenquelle:</i>	Dual MALDI/ ESI ion source
<i>Software:</i>	Chipsoft
<i>Autosampler:</i>	Advion TriVersa Nanomate robotic nano electrospray ion source with D-Chip (4,1 $\mu\text{m}$ Innendurchmesser), Advion Biosciences, Ithaca, USA
<i>Lösungsmittel:</i>	Gemisch aus Wasser/ Propan-2-ol/ 7 M Triethylamine/ Essigsäure (50:50:0,06:0,02 v/v/v/v)

## 9.6.2 Q-Exactive Massenspektrometrie

<i>Massenspektrometer:</i>	Hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer
<i>Software:</i>	XCalibur 3.0.63
<i>Lösungsmittel:</i>	Gemisch aus Wasser/ Propan-2-ol/ 7 M Triethylamine/ Essigsäure (50:50:0,06:0,02 v/v/v/v)

## 9.7 Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

<i>GC-Gerät:</i>	Agilent Technologies 6890N Network GC System
<i>Autosampler:</i>	Agilent Technologies 7683B Series Injector
<i>Massenspektrometer:</i>	Agilent Technologies 5975 inert XL Mass selective Detektor
<i>Säule:</i>	30-m HP-5MS (Hewlett-Pachard), 30 m x 250 µm
<i>Flussrate Säule:</i>	1,1 mL/min
<i>Mess-Software:</i>	5975 MSD OnLine
<i>Auswerte-Software:</i>	5975 MSD OnLine Data Analysis

### *Methode:*

*Methode I:* initiale Temperatur bei 70 °C für 1,5 min, mit 60 °C/min linear aufgeheizt auf 150 °C, Temp. für 3 min gehalten, mit 5 °C/min linear aufgeheizt auf 320 °C.

### *Probenvorbereitung:*

Die trockenen Proben nach der HF-Behandlung (siehe **Kapitel 9.4.4**) wurden für 4 h mit 1 mL 4 M TFA bei 100 °C inkubiert und anschließend unter einem Stickstoffstrom und unter Wärmeeinfluss (ca. 50 °C) getrocknet. Im Anschluss erfolgte von den trockenen Proben eine starke Methanolyse, dafür wurden die Proben in 100 µL 2 M MeOH/ HCl für 2 h bei 85 °C inkubiert. Auch hier erfolgte im Anschluss ein Trocknen der Proben unter Stickstoffstrom und Wärmeeinfluss. Die Proben wurden dreimal in 200 µL trockenem MeOH resuspendiert und unter Stickstoffstrom sowie mit Wärmeeinfluss getrocknet. !! Es musste sehr genau darauf geachtet werden, dass die trockenen Proben sofort mit Lösungsmittel versetzt werden, um ein Verdampfen von Anhydro-Ribitol und Ribitol zu unterbinden. !! Es folgte ein Peracetylieren mit 100 µL Pyridin und 100 µL Acetanhydrid. Die Lösung wurde für 15 min bei 85 °C inkubiert. Auch hier folgten mehrere Trocknungsschritte unter einem Stickstoffstrom

und unter Wärmeeinfluss, wobei die trockenen Proben viermal mit 100 µL MeOH versetzt wurden. !! Auch hierbei muss sehr genau darauf geachtet werden, dass bei den Waschschrritten mit MeOH sofort Lösungsmittel auf die trockene Probe gegeben wird. !! Zum Schluss wurden die trockenen Proben in 1000 µL CHCl<sub>3</sub> aufgenommen.

### 9.7.1 Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung

Ausgehend von den Standardreihen konnten aus den Peakflächen der verschiedenen Proben der Gehalt an Ribitol und 1,4-Anhydro-Ribitol berechnet werden. Dabei ergaben sich aus den Geradengleichungen aus der **Abbildung 37 B** und **D** folgende Gleichungen:

**Formel 1: Geradengleichung sowie das Umstellen der Gleichung nach X für 1,4-Anhydro-Ribitol.**

$$y = 2.726.984,47x - 1.325.530,57$$

$$x = \frac{y + 1.325.530,57}{2.726.984,47}$$

**Formel 2: Geradengleichung sowie das Umstellen der Gleichung nach X für Ribitol.**

$$y = 3.261.280,62x - 1.378.668,73$$

$$x = \frac{y + 1.378.668,73}{3.261.280,62}$$

Zunächst wurde der Gehalt an 1,4-Anhydro-Ribitol und Ribitol aus den entsprechenden Peakflächen mit Hilfe der dazugehörigen Geradengleichung (siehe **Formel 1** und **2**) ermittelt. Weiterhin musste berücksichtigt werden, dass von den jeweiligen Proben nur ein Teil der Proben mit der HF-Behandlung aufgeschlossen wurden (siehe **Formel 3**):

**Formel 3: Berechnung Faktor eingesetzte Menge in Bezug auf die Ausgangsauswaage.**

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Gesamt Auswaage [mg]}}{\text{eingesetzte Menge [mg]}}$$

Im Anschluss konnte, unter Berücksichtigung des zuvor berechneten Faktors (**Formel 3**), die Ribitol-Menge auf das Gewicht der einzelnen Proben ermittelt werden (siehe **Formel 4**):

**Formel 4: Berechnung der korrigierten Ribitol-Menge unter Berücksichtigung des Faktors.**

$$\text{korrigierte Ribitol-Menge} = \text{berechnete Menge [\mu\text{g}]} * \text{Faktor}$$

Einheit: [µg]

Des Weiteren musste in der Berechnung beachtet werden, dass von dem Zellpellet eine Rückstellprobe entnommen wurde (siehe **Formel 5**), was eine veränderte Menge des Zellpellets für die weitere Aufarbeitung bedingte:

**Formel 5: Berechnung des Faktors unter Berücksichtigung der Entnahme einer Rückstellprobe von der Ausgangswaage des Zellpellets.**

$$\text{Faktor Rückstellprobe} = \frac{\text{Gesamtauswaage [mg]} - \text{Rückstellprobe [mg]}}{\text{Gesamtauswaage [mg]}}$$

Einheit: [mg]

Zum Schluss konnte anhand dessen die Gesamt-Ribitol-Menge bezogen auf ein mg Zellpellet bestimmt werden. Damit ergab sich für die Berechnung des Gesamt-Ribitol-Gehaltes unter Berücksichtigung der korrigierten Ribitol-Menge und des Faktors für die Rückstellprobe folgende **Formel 6**:

**Formel 6: Berechnung der Ribitol-Menge pro mg Ausgangszellpellet unter Berücksichtigung der korrigierten Ribitol-Menge und des Faktors für die Rückstellprobe.**

$$\text{Menge Ribitol pro mg Zellpellet} = \frac{\text{korrigierte Ribitol-Menge [\mu\text{g}]}}{\text{Auswaage [mg]}} * \text{Faktor Rückstellprobe [mg]}$$

Einheit: [ $\mu\text{g}$ ]

Mit dem Gesamt-Ribitol-Gehalt pro mg Zellpellet konnte anschließend das Verhältnis LTA zu WTA kalkuliert werden. Dafür wurden die berechneten Werte für LTA und WTA pro mg Zellpellet zum Schluss addiert und davon die prozentuale Verteilung ermittelt.

## 10. NMR Datensätze

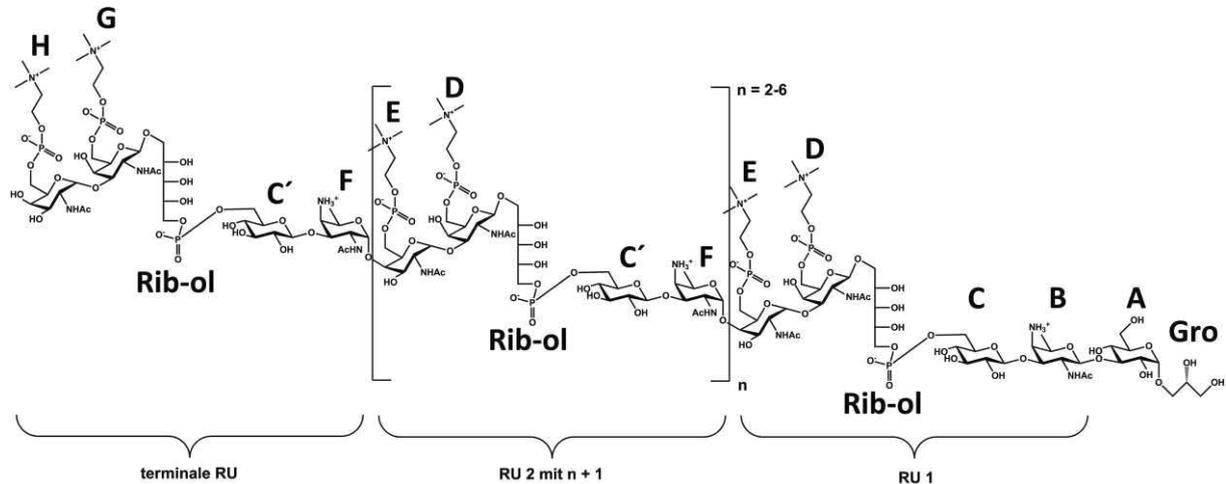
10.1 TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce

Abbildung 46: Struktur für de-O-acylierte LTA von dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce inklusive der Nomenklatur für die verschiedenen Zucker basierend auf [34].

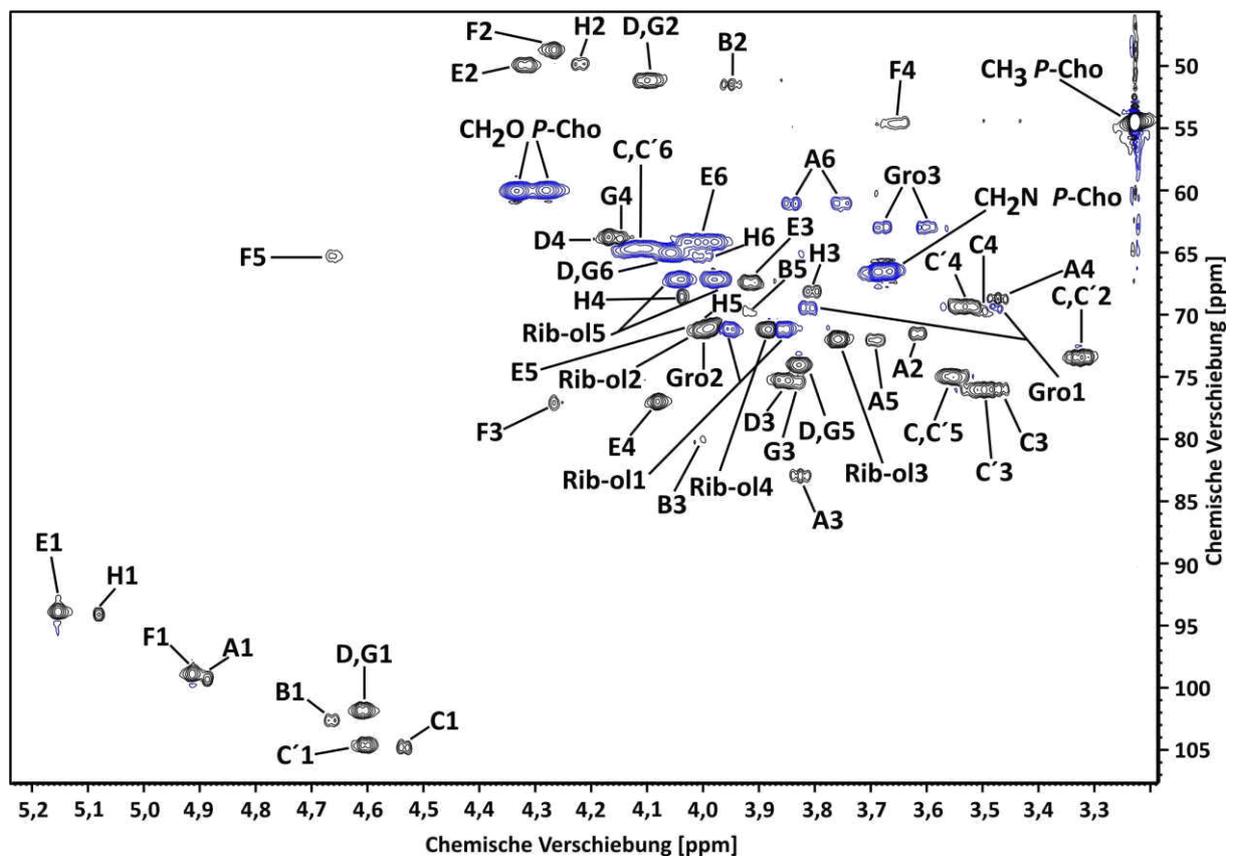


Abbildung 47:  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-dept-Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 700 MHz;  $\delta_{\text{H}}$  5,24-3,19;  $\delta_{\text{C}}$  107-46) für de-O-acylierte LTA aus *S. pneumoniae* TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce inklusive der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern. Nomenklatur basiert auf [34] und ist der Struktur in der **Abbildung 46** zuzuordnen. Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebungen sind in der **Tabelle 17** aufgelistet.

**Tabelle 18:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebungen für die de-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cpsApc*. Die dazugehörige Struktur ist in **Abbildung 46** und das entsprechende  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-dept-Spektrum ist in **Abbildung 47** dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. \* nicht aufgelöstes Multiplet, <sup>§</sup> Zuordnung erfolgte unter zu Hilfe von [34]

Reste	Chemische Verschiebung ( $\delta$ , ppm)						NAc
	H1 - C1	H2 - C2	H3 - C3	H4 - C4	H5 - C5	H6 - C6	
<b>A</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ )	4,89 [d 3,7 Hz] <i>99,3</i>	3,63-3,60* <i>71,5</i>	3,85-3,81* <i>83,1</i>	3,49-3,46* <i>68,8</i>	3,71-3,67* <i>72,1</i>	3,77-3,74* 3,86-3,82* <i>61,2</i>	
<b>B</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,67-4,63* <i>102,6</i>	3,98-3,94* <i>51,5</i>	4,01-3,98* <i>80,1</i>	n.b. <i>54,3</i>	3,94-3,90* <i>69,8</i>	1,29 [d 6,6 Hz] <i>16,7</i>	2,02 <i>22,6/ 175,6<sup>§</sup></i>
<b>C</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ )	4,53 [d 7,9 Hz] <i>104,8</i>	3,34-3,31* <i>73,5</i>	3,50-3,47* <i>76,1</i>	3,52-3,48* <i>69,4</i>	3,58-3,54* <i>75,1</i>	4,11-4,08* 4,16-4,11* <i>64,8-64,7*</i>	
<b>D</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-6- <i>O</i> -P-Cho-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,61 [d 7,4] <i>101,8</i>	4,13-4,08* <i>51,2</i>	3,88-3,84* <i>75,3</i>	4,19-4,16* <i>63,9</i>	3,85-3,80* <i>74,2-74,1</i>	4,08-4,03* 4,08-4,03* <i>65,2</i> [d 5,1 Hz]	2,09 <i>22,9/ 175,3</i>
<b>E</b> ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-6- <i>O</i> -P-Cho-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	5,15 [d 3,4 Hz] <i>93,8</i>	4,34-4,30* <i>50,0</i>	3,93-3,89* <i>67,4</i>	4,10-4,06* <i>77,0</i>	4,02-3,98* <i>71,1</i>	4,01-3,96* 4,05-4,01* <i>64,3-64,2*</i>	2,09 <i>22,9/ 175,2</i>
<b>F</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,91 [d 2,8 Hz] <i>98,9</i>	4,29-4,25* <i>48,8</i>	4,28-4,26* <i>77,1</i>	3,68-3,63* <i>54,6</i>	4,68-4,64* <i>65,3</i>	1,19 [d 6,4 Hz] <i>16,2</i>	2,07 <i>22,6/ 175,0</i>
<b>C'</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ )	4,60 [d 6,5 Hz] <i>104,6</i>	3,36-3,30* <i>73,5</i>	3,53-3,48* <i>76,1</i>	3,56-3,50* <i>69,3</i>	3,58-3,54* <i>75,1</i>	4,04-4,08* 4,16-4,04* <i>64,8-64,7*</i>	
<b>G</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-6- <i>O</i> -P-Cho-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,61 [d 7,4 Hz] <i>101,8</i>	4,13-4,08* <i>51,2</i>	3,86-3,82* <i>75,4</i>	4,16-4,13* <i>63,9</i>	3,85-3,80* <i>74,1</i>	4,08-4,03* 4,08-4,03* <i>65,1</i> [d 5,1 Hz]	2,09 <i>22,9/ 175,3</i>
<b>H</b> $\alpha$ -D-6- <i>O</i> -P-Cho-GalpNAc <sup>term</sup> -(1 $\rightarrow$ )	5,08 [d 3,7 Hz] <i>94,1</i>	4,24-4,20* <i>49,8</i>	3,83-3,78* <i>68,2</i>	4,05-4,03* <i>68,6</i>	4,00-3,97* <sup>[§]</sup> <i>70,8</i> <sup>[§]</sup>	4,03-3,98* 4,06-4,03* <i>65,3</i> [d 5,1 Hz]	2,04 <i>22,6/ 175,2</i>
( $\rightarrow$ 1)-Rib-ol-5- <i>P</i> -( <i>O</i> $\rightarrow$ )	3,87-3,84* 3,97-3,94* <i>71,2</i>	3,99-3,95* <i>71,1</i>	3,78-3,74* <i>72,0</i>	3,91-3,87* <i>71,2</i>	4,00-3,95* 4,07-4,02* <i>67,3</i> [d 5,1 Hz]		
Glycerol-(1 $\rightarrow$ )	3,49-3,46* 3,83-3,79* <i>69,5</i>	3,99-3,96* <i>71,2</i>	3,62-3,58* 3,70-3,66* <i>63,1</i>				
<b>P-Cho</b> (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @D,G)	4,37-4,30* <i>60,1</i> [d 4,8 Hz]	3,71-3,67* <i>66,5</i>	3,23 <i>54,5</i>				
<b>P-Cho</b> (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @H)	4,35-4,30* <i>60,1</i> [d 4,8 Hz]	3,70-3,67* <i>66,5</i>	3,23 <i>54,5</i>				
<b>P-Cho</b> (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @E)	4,31-4,25* <i>60,0</i> [d 4,8 Hz]	3,68-3,65* <i>66,6</i>	3,23 <i>54,5</i>				
<sup>31</sup> P	P-5Rib-ol/6C' 1,89	P-5Rib-ol/6C 1,80	P-Cho <sup><math>\beta</math>-D-GalpNAc</sup> 0,33	P-Cho <sup><math>\alpha</math>-D-GalpNAc,term</sup> 0,13	P-Cho <sup><math>\alpha</math>-D-GalpNAc</sup> -0,15		

10.2 TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2

X = P-Cho oder H

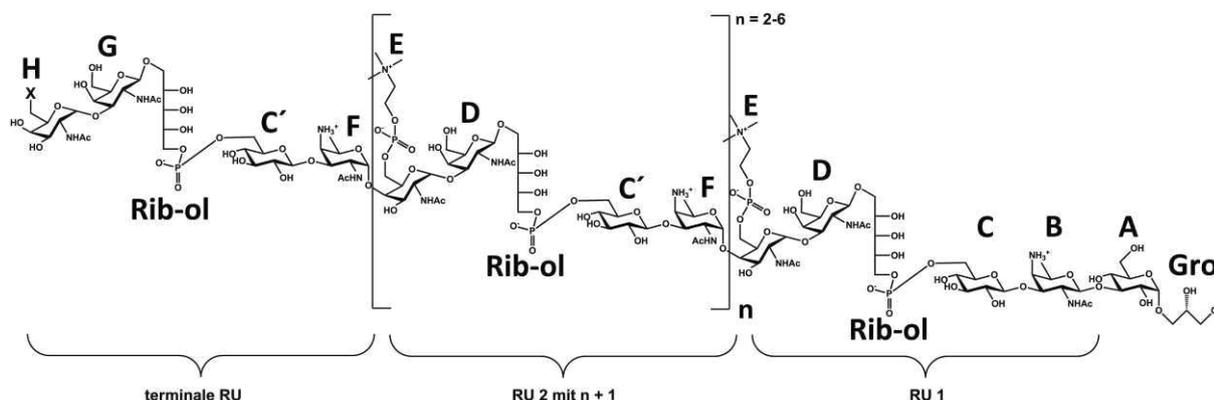


Abbildung 48: Struktur für de-O-acylierte LTA aus den *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2 inklusive der Nomenklatur der verschiedenen Zucker basierend auf [34].

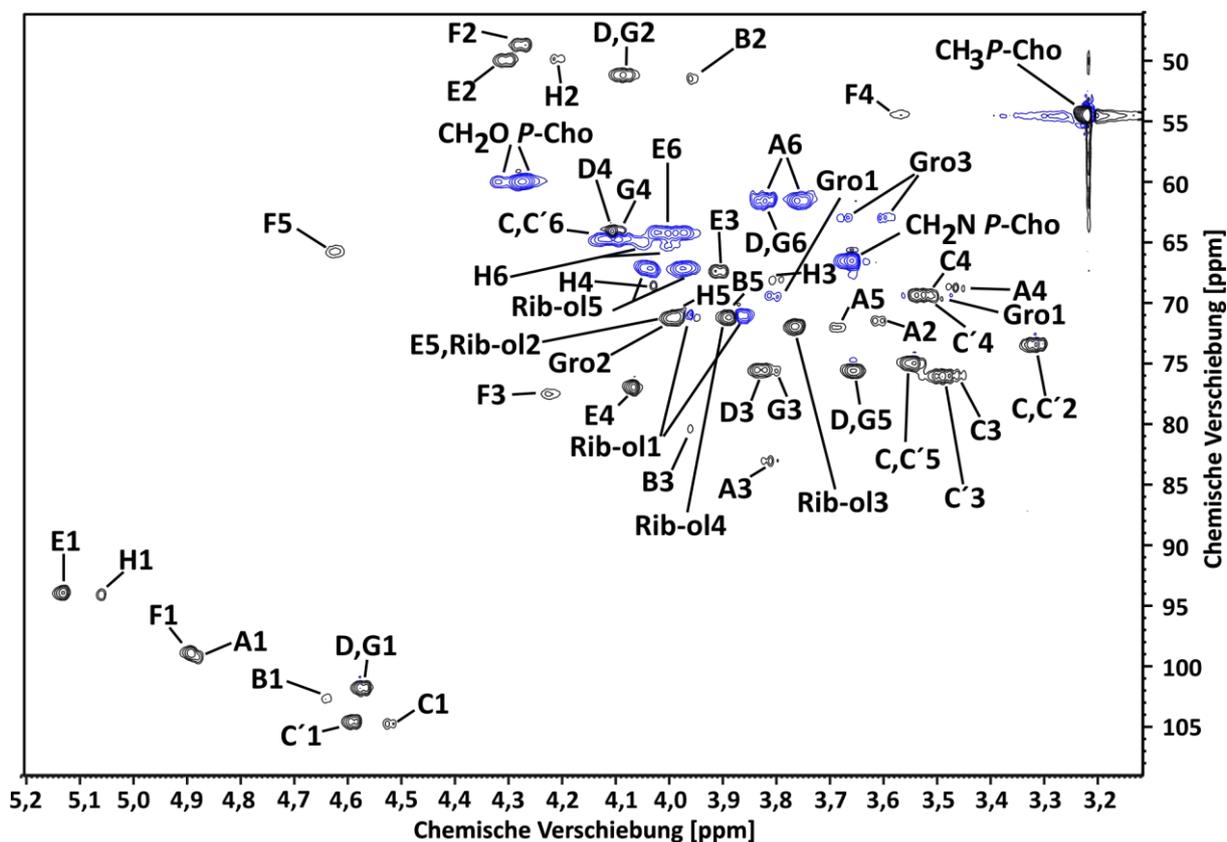


Abbildung 49:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-dept-Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 700 MHz;  $\delta_{\text{H}}$  5,20-3,10;  $\delta_{\text{C}}$  108-46) für die de-O-acylierte LTA aus *S. pneumoniae* TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2 mit der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern. Die Nomenklatur sowie die Zuordnung zu einzelnen Zuckern kann der **Abbildung 48** entnommen werden. Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebungen sind in der **Tabelle 18** aufgelistet.

**Tabelle 19:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebungen für die de-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cpsΔlicD2*. Die dazugehörige Struktur ist in **Abbildung 48** und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in **Abbildung 49** dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. \* nicht aufgelöstes Multiplet

Reste	Chemische Verschiebung ( $\delta$ , ppm)						NAc
	H1 - C1	H2 - C2	H3 - C3	H4 - C4	H5 - C5	H6 - C6	
<b>A</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,89-4,87* 99,3	3,63-3,58* 71,5	3,83-3,79* 83,1	3,49-3,44* 68,8	3,71-3,67* 72,1	3,78-3,72* 3,85-3,80* 61,1	
<b>B</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,66-4,63* 102,7	3,97-3,94* 51,6	3,99-3,94* 80,5	3,44-3,40 54,1	3,92-3,86* 70,2	1,29 16,7	2,02 <sup>s</sup> 22,9/ 175,6
<b>C</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,53 [d 7,9 Hz] 104,8	3,35-3,30* 73,5	3,48-3,44* 76,0	3,55-3,49* 69,5	3,57-3,53* 75,1	4,16-4,06* 64,9	
<b>D</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D- GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,58 [d 8,8 Hz] 101,8	4,11-4,05* 51,3	3,86-3,81* 75,6	4,11-4,09* 64,2	3,68-3,63* 75,6	3,78-3,73* 3,85-3,80* 61,6	2,08 23,1/ 175,3
<b>E</b> ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-6- <i>O</i> - <i>P</i> - Cho-GalpNAc- (1 $\rightarrow$ )	5,14 [d 3,2 Hz] 94,0	4,33-4,28* 50,3	3,93-3,89* 67,5	4,09-4,05* 77,0	4,02-3,97* 71,3	3,99-3,95* 4,04-3,99* 64,3	2,05 22,7/ 175,2
<b>F</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,90 [d 3,4 Hz] 99,0	4,31-4,25* 48,8	4,25-4,19* 77,6	3,59-3,54* 54,5	4,65-4,60* 65,9	1,18 [d 6,4 Hz] 16,3	2,09 22,7/ 175,0
<b>C'</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,60 [d 8,1 Hz] 104,6	3,35-3,29* 73,5	3,52-3,47* 76,1	3,53-3,48* 69,8	3,56-3,52* 75,1	4,16-4,06* 64,8	
<b>G</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D- GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,59-4,55 101,8	4,11-4,05* 51,3	3,82-3,79* 75,7	4,10-4,08* 64,1	3,67-3,62* 75,7	3,78-3,73* 3,85-3,80* 61,8	2,07 22,8/ 175,4
<b>H</b> $\alpha$ -D-6- <i>O</i> - <i>P</i> -Cho- GalpNAc <sub>term</sub> - (1 $\rightarrow$ )	5,07 [d 3,6 Hz] 94,2	4,23-4,19* 49,9	3,82-3,78* 68,2	4,04-4,02* 68,6	4,00-3,96* 70,7	4,02-3,97* 4,07-4,04* 65,1	2,04 <sup>s</sup> 22,5/ 175,3
( $\rightarrow$ 1)-Rib-ol-5- <i>P</i> - ( <i>O</i> $\rightarrow$ )	3,88-3,84* 3,97-3,94* 71,1	4,01-3,97* 71,3	3,79-3,75* 72,0	3,92-3,87* 71,3	4,00-3,95* 4,07-4,02* 67,3		
Glycerol-(1 $\rightarrow$ )	3,49-3,46* 3,83-3,79* 69,5	3,99-3,96* 71,4	3,62-3,57* 3,69-3,66* 63,1				
<b>P-Cho</b> (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @E)	4,31-4,26* 60,1 [d 5,2 Hz]	3,68-3,65* 66,7-66,5*	3,23 54,5				
<b>P-Cho</b> (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @H)	4,35-4,30* 60,1 [d 5,2 Hz]	3,70-3,67* 66,7-66,5*	3,23 54,5				
$^{31}\text{P}$	P-5Rib-ol/6 <sup>C</sup> 1,88	P-5Rib-ol/6 <sup>C</sup> 1,79		P-Cho $\alpha$ -D-GalpNAc,term 0,12		P-Cho $\alpha$ -D-GalpNAc -0,15	

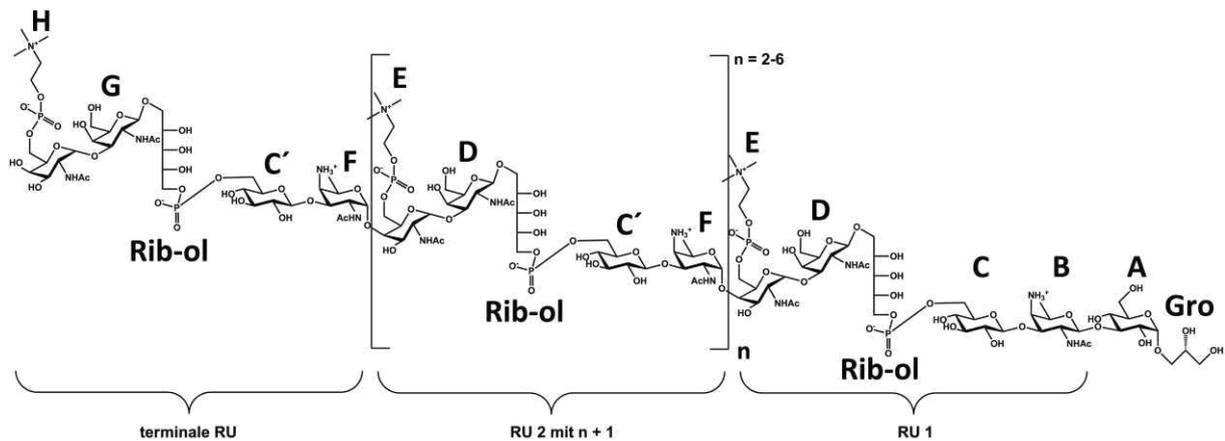
10.3 TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2

Abbildung 50: *S. pneumoniae* Struktur für de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2 inklusive der Zuordnung der Zucker. Die Nomenklatur der Zucker erfolgte anlehend an[34].

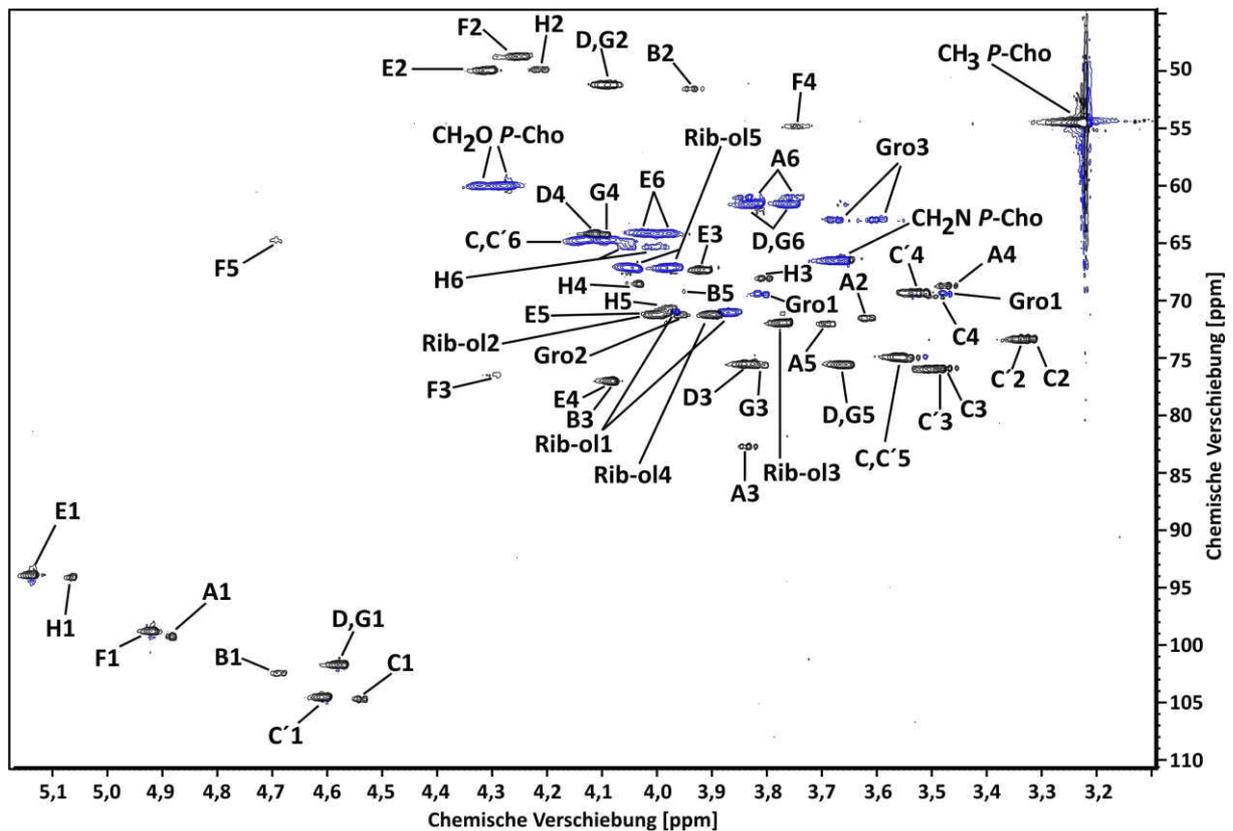


Abbildung 51:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-dept-Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 700 MHz;  $\delta_{\text{H}}$  5,15-3,15;  $\delta_{\text{C}}$  111-44) mit der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern für die de-O-acylierte LTA aus *S. pneumoniae* TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2. Die Nomenklatur der einzelnen Zucker kann der **Abbildung 50** und die einzelnen  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebungen sind in der **Tabelle 19** aufgelistet.

**Tabelle 20:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebungen für die de-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm TIGR4Δ*cpsA*Δ*pceA*Δ*licD2*. Die dazugehörige Struktur ist in **Abbildung 50** und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in **Abbildung 51** dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. \* nicht aufgelöstes Multiplet

Reste	Chemische Verschiebung ( $\delta$ , ppm)						NAc
	H1 - C1	H2 - C2	H3 - C3	H4 - C4	H5 - C5	H6 - C6	
<b>A</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,89 [d 3,8 Hz] <i>99,4</i>	3,64-3,59* <i>71,7</i>	3,85-3,81* <i>82,7</i>	3,50-3,45* <i>68,7</i>	3,71-3,67* <i>72,1</i>	3,77-3,73* 3,86-3,82* <i>61,1</i>	
<b>B</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,71-4,67 <i>102,5</i>	3,96-3,91* <i>51,6</i>	4,08-4,02* <i>77,1</i>	n.b. <i>54,4</i>	3,96-3,93* <i>69,2</i>	1,31 [d 6,0 Hz] <i>16,5</i>	2,02 <i>22,9/ 175,6</i>
<b>C</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,54 [d 8,0 Hz] <i>104,8</i>	3,35-3,30* <i>73,4</i>	3,49-3,46* <i>76,0</i>	3,51-3,47* <i>69,3</i>	3,57-3,53* <i>75,2</i> [d 8,1]	4,17-4,09* 4,17-4,09* <i>64,9-64,7*</i>	
<b>D</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D- GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,58 [d 8,6 Hz] <i>101,8</i>	4,11-4,06* <i>51,2</i>	3,86-3,80* <i>75,6</i>	4,14-4,10* <i>64,2</i>	3,68-3,64* <i>75,6</i>	3,78-3,74* 3,86-3,80* <i>61,2</i>	2,08 <i>23,1/ 175,4</i>
<b>E</b> ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-6- <i>O</i> - <i>P</i> -Cho- GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	5,14 [d 3,7 Hz] <i>94,0</i>	4,33-4,28* <i>50,0</i>	3,94-3,89* <i>67,3</i>	4,10-4,07* <i>77,1</i>	4,00-3,96* <i>71,2</i>	4,00-3,97* 4,04-4,00* <i>64,3-64,2*</i>	2,04 <i>22,5/ 175,2</i>
<b>F</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,94-4,90* <i>98,9</i>	4,27-4,22* <i>48,8</i>	4,32-4,28* <i>76,6</i>	3,77-3,72* <i>54,8</i>	4,71-4,67* <i>64,8</i>	1,20 [d 6,2 Hz] <i>16,1</i>	2,09 <i>22,6/ 175,0</i>
<b>C'</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,61 [d 8,1 Hz] <i>104,6</i>	3,37-3,32* <i>73,4</i>	3,52-3,47* <i>76,0</i>	3,55-3,50* <i>69,4</i>	3,58-3,53* <i>75,0</i> [d 7,8]	4,11-4,07* 4,17-4,11 <i>64,9-64,7*</i>	
<b>G</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D- GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,58 [d 8,4 Hz] <i>101,8</i>	4,11-4,06 <i>51,2</i>	3,83-3,79* <i>75,6</i>	4,10-4,08* <i>64,3</i>	3,65-3,61* <i>75,6</i>	3,86-3,80* 3,78-3,74* <i>61,6</i>	2,08 <i>23,1/ 175,4</i>
<b>H</b> $\alpha$ -D-6- <i>O</i> - <i>P</i> - Cho-GalpNAc term-(1 $\rightarrow$ )	5,06 [d 3,8 Hz] <i>94,2</i>	4,23-4,19 <i>49,9</i>	3,82-3,79* <i>68,1</i>	4,04-4,02* <i>68,6</i>	3,99-3,96* <i>70,7</i>	4,03-3,98* 4,07-4,04* <i>65,4</i> [d 4,9 Hz]	2,03 <i>22,5/ 175,2</i>
( $\rightarrow$ 1)-Rib-ol-5- <i>P</i> -( <i>O</i> $\rightarrow$ )	3,89-3,85* 3,98-3,95* <i>71,1</i>	4,02-3,98* <i>71,2</i>	3,79-3,75* <i>72,0</i>	3,92-3,88* <i>71,3</i>	4,00-3,96* 4,07-4,03* <i>67,3-67,2*</i>		
Glycerol-(1 $\rightarrow$ )	3,50-3,46* 3,83-3,79* <i>69,5</i>	3,98-3,94* <i>71,3</i>	3,62-3,58* 3,69-3,66* <i>63,0</i>				
<i>P</i> -Cho (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @E)	<b>CH<sub>2</sub>O</b> 4,31-4,26* <i>60,0</i> [d 4,7 Hz]	<b>CH<sub>2</sub>N</b> 3,70-3,64* <i>66,6</i>	<b>CH<sub>3</sub></b> 3,23 <i>54,7</i>				
<i>P</i> -Cho (6- <i>O</i> $\rightarrow$ @H)	4,34-4,31* <i>60,0</i> [d 4,7 Hz]	3,70-3,64* <i>66,6</i>	3,23 <i>54,7</i>				
$^{31}\text{P}$	<i>P</i> -5 <sup>Rib-ol</sup> /6 <sup>C</sup> 1,89	<i>P</i> -5 <sup>Rib-ol</sup> /6 <sup>C</sup> 1,81	<i>P</i> -Cho <sup><math>\alpha</math>-D-GalpNAc,term</sup> 0,11	<i>P</i> -Cho <sup><math>\alpha</math>-D-GalpNAc</sup> -0,16			

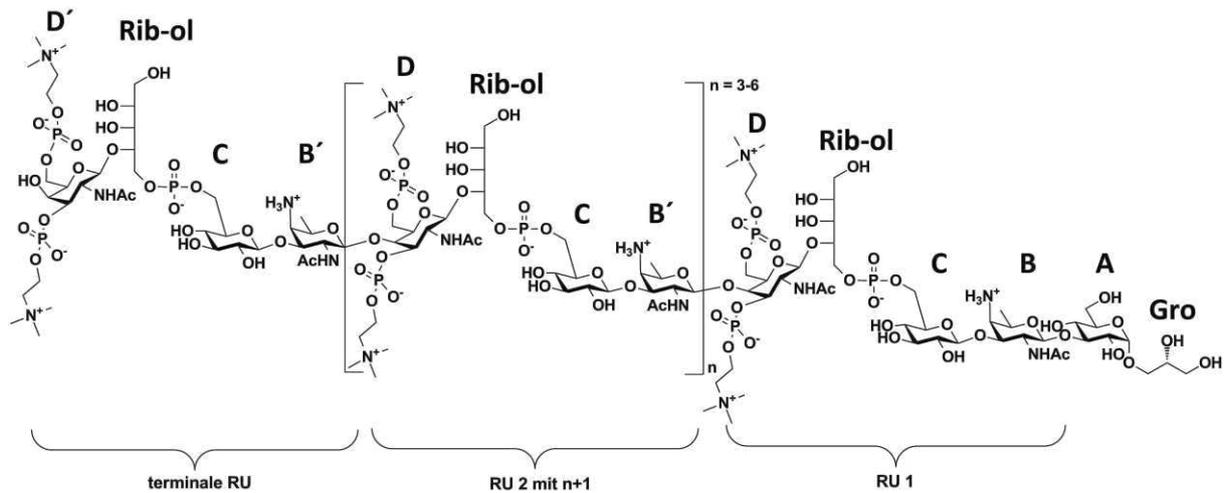
10.4 D39Cho<sup>-</sup>

Abbildung 52: Struktur für die de-O-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho<sup>-</sup> inklusive der Nomenklatur der Zucker.

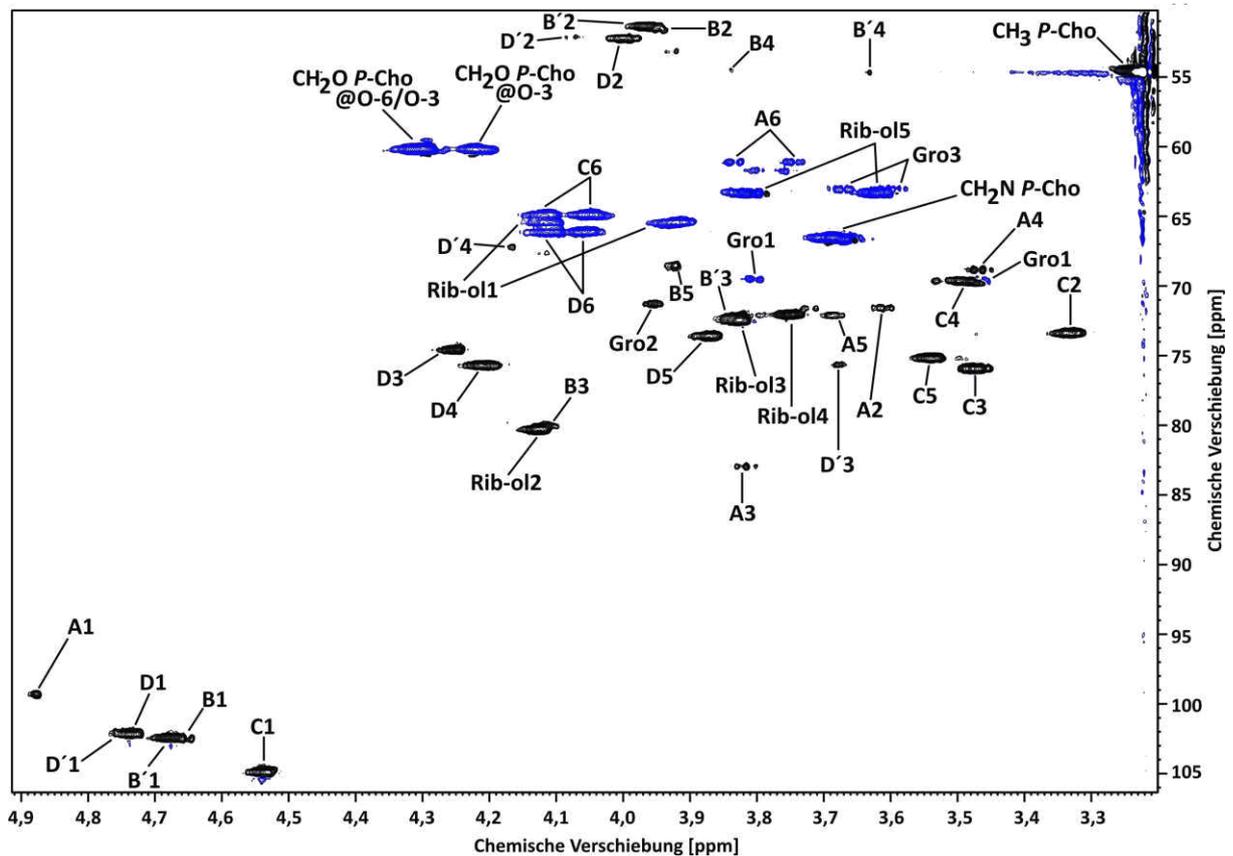


Abbildung 53: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC-dept-Spektrum (D<sub>2</sub>O; 300 K; 700 MHz;  $\delta_H$  5,00-3,15;  $\delta_C$  107-49) für die de-O-acylierte LTA aus *S. pneumoniae* D39Cho<sup>-</sup> mit der Zuordnung der verschiedenen Zuckern anlehnend an *Abbildung 52*. Die <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C und <sup>31</sup>P chemischen Verschiebungen sind in der *Tabelle 20* aufgelistet.

**Tabelle 21:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebungen für die de-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho. Die dazugehörige Struktur ist in **Abbildung 52** und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in **Abbildung 53** dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. \* nicht aufgelöstes Multiplet, <sup>§</sup> Bestimmung erfolgte bei 295 K

Reste	Chemische Verschiebung ( $\delta$ , ppm)						
	H1 - C1	H2 - C2	H3 - C3	H4 - C4	H5 - C5	H6 - C6	NAC
<b>A</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,89 [d 3,6 Hz] 99,3	3,63-3,58* 71,5	3,84-3,80* 82,9	3,49-3,45* 68,8	3,71-3,66* 72,0	3,77-3,73* 3,86-3,81* 61,1	
<b>B</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,67-4,64* 102,5	3,96-3,93* 51,5	4,14-4,09* 80,0	3,85-3,83* 54,4	3,95-3,90* 69,2	1,30 [d 6,5 Hz] 16,7	2,02 22,9/175,7
<b>C</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc- (1 $\rightarrow$ )	4,53 [d 7,7 Hz] 104,9	3,35-3,30* 73,4	3,49-3,46* 75,9	3,51-3,47* 69,6	3,56-3,52* 75,1	4,08-4,02* 4,15-4,09* 65,0-64,8*	
<b>D</b> ( $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-3,6-di- P-Cho-GalpNAC- (1 $\rightarrow$ )	4,74 [d 8,5 Hz] 102,1	4,02-3,97* 52,3-52,2*	4,28-4,23* 74,6-74,5*	4,22-4,18* 75,7	3,90-3,86* 73,5-73,4*	4,09-4,02* 4,15-4,08* 66,2-66,1*	2,07 23,1/175,2
<b>B'</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,67 [d 8,2 Hz] 102,4	4,00-3,94* 51,3	3,85-3,81* 72,4	3,64-3,62* 54,8	3,94-3,91* 68,3	1,33 [d 6,1 Hz] 16,7	2,07 23,1/175,7
<b>D'</b> $\beta$ -D-3,6-di-P- Cho- GalpNAC <sub>term</sub> - (1 $\rightarrow$ )	4,76 <sup>§</sup> [d 8,6 Hz] 102,0	4,09-4,06* <sup>§</sup> 52,3-52,2*	3,69-3,66* <sup>§</sup> 75,8-75,7*	4,18-4,16* <sup>§</sup> 67,2	3,92-3,89 69,7	n.b. 23,2/175,4	2,09
( $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-1-P- (O $\rightarrow$ )	3,96-3,89* 4,14-4,09* 65,5-65,4*	4,15-4,11* 80,3 [d 7,2 Hz]	3,86-3,81* 72,4	3,77-3,73* 72,0	3,65-3,60* 3,85-3,79* 63,2		
Glycerol-(1 $\rightarrow$ )	3,48-3,45* 3,82-3,79* 69,5	3,98-3,94* 71,3	3,62-3,57* 3,70-3,65* 63,0				
	<b>CH<sub>2</sub>O</b>	<b>CH<sub>2</sub>N</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>				
P-Cho (3-O $\rightarrow$ @D)	4,24-4,18* 4,34-4,29* 60,2 [d 4,9 Hz]	3,71-3,67* 66,7-66,5*	3,23 54,6				
P-Cho (6-O $\rightarrow$ @D)	4,34-4,28* 60,1 [d 5,1 Hz]	3,69-3,66* 66,7-66,5*	3,23 54,6				
P-Cho (3-O $\rightarrow$ @D' <sub>term</sub> )	4,24-4,18* 4,31-4,26* 60,2 [d 4,9 Hz]	3,68-3,64* 66,7-66,5*	3,22 54,6				
P-Cho (6-O $\rightarrow$ @D' <sub>term</sub> )	4,34-4,28* 60,1 [d 5,1 Hz]	3,69-3,66* 66,7-66,5*	3,23 54,6				
<b><sup>31</sup>P</b>	P-1 <sup>Rib-ol</sup> /6 <sup>C</sup> 1,48	P-6 <sup>D(term)</sup> /CH <sub>2</sub> O <sup>Cho</sup> 0,27	P-6 <sup>D</sup> /CH <sub>2</sub> O <sup>Cho</sup> 0,20	P-3 <sup>D(term)</sup> /CH <sub>2</sub> O <sup>Cho</sup> -0,78	P-3 <sup>D</sup> /CH <sub>2</sub> O <sup>Cho</sup> -1,08		

## 10.5 D39Cho'licA64

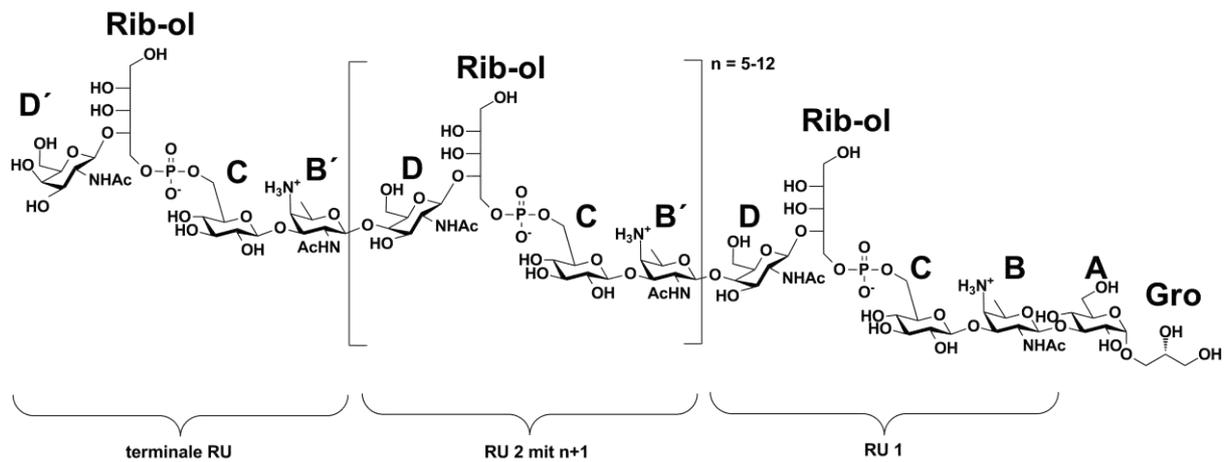


Abbildung 54: *S. pneumoniae* der de-O-acylierten LTA für den Stamm D39Cho'licA64 inklusive der Nomenklatur der verschiedenen Zucker.

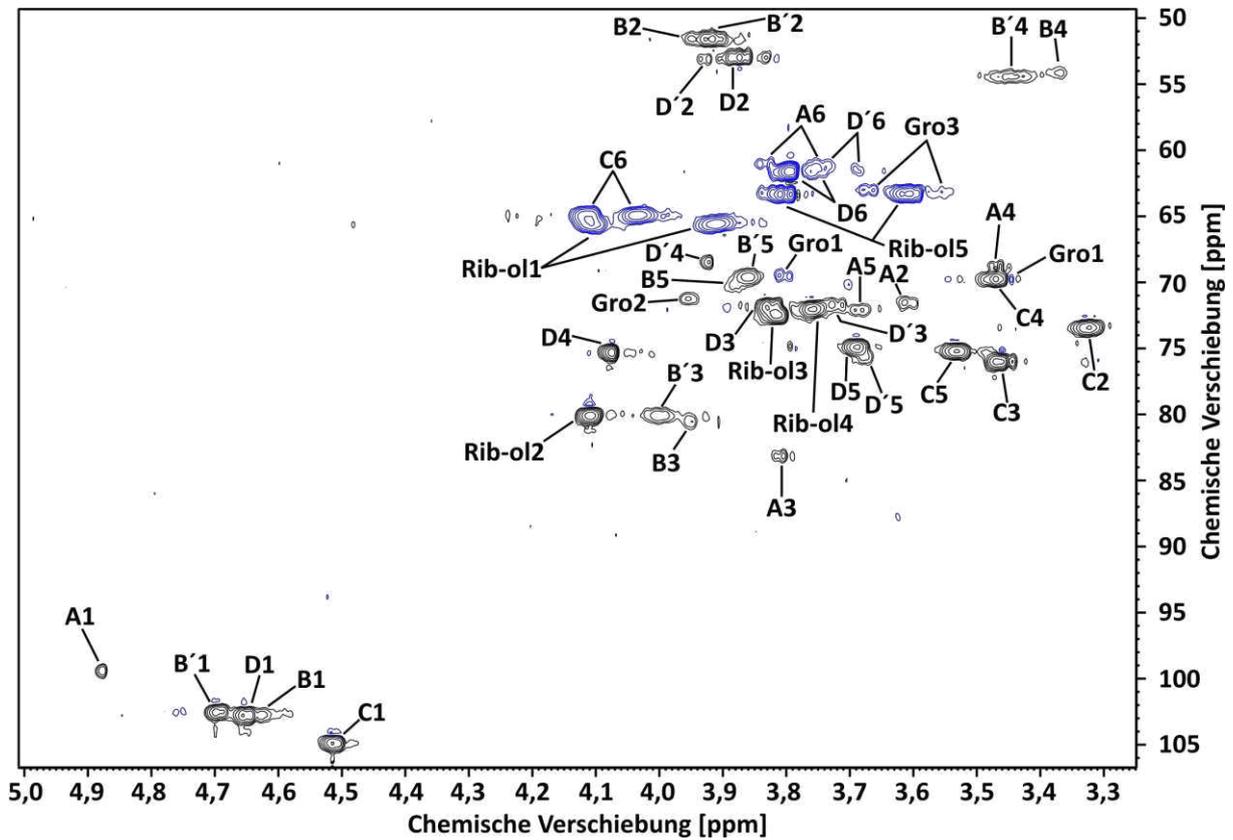


Abbildung 55:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-dept-Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 700 MHz;  $\delta_{\text{H}}$  5,00-3,25;  $\delta_{\text{C}}$  106-50) für die de-O-acylierte LTA aus *S. pneumoniae* D39Cho'licA64 mit der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern basierend auf **Abbildung 54**. Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebungen sind in der **Tabelle 21** aufgelistet.

**Tabelle 22:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebungen für die de-*O*-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho-licA64. Die dazugehörige Struktur ist in **Abbildung 54** und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in **Abbildung 55** dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. \* nicht aufgelöstes Multiplet

Reste	Chemische Verschiebung ( $\delta$ , ppm)						NAc
	H1 - C1	H2 - C2	H3 - C3	H4 - C4	H5 - C5	H6 - C6	
<b>A</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ )	4,89 [d 3,5 Hz]	3,62-3,59*	3,82-3,78*	3,48-3,44*	3,70-3,67*	3,77-3,73* 3,85-3,81*	
	99,4	71,5	83,1	68,8	72,1	61,0	
<b>B</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,63 [d 7,8]	3,96-3,93*	3,96-3,94*	3,39-3,35*	3,90-3,81*	1,29 [d 6,0 Hz]	2,03
	102,7	51,6	80,5	54,1	70,1	16,5	22,9/ 175,7
<b>C</b> ( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ )	4,52 [d 7,8 Hz]	3,36-3,30*	3,48-3,43*	3,50-3,45*	3,56-3,51*	4,06-4,02* 4,14-4,09*	
	104,9	73,5	76,0	69,7	75,2 [d 6,5]	65,0-64,9*	
<b>D</b> ( $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )	4,66 [d 8,2 Hz]	3,90-3,85*	3,85-3,81*	4,09-4,06*	3,71-3,67*	3,78-3,73* 3,83-3,78*	2,05
	102,7	53,0	71,8	75,3	74,9	61,6	22,9/ 175,5
<b>B'</b> ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGalp-(1 $\rightarrow$ )	4,70 [d 8,2 Hz]	3,94-3,89*	4,02-3,97*	3,48-3,41*	3,88-3,84*	1,29 [d 6,0 Hz]	2,00
	102,5	51,5	80,0	54,4	69,6	16,5	22,8/ 175,6
<b>D'</b> $\beta$ -D-GalpNAc <sub>term</sub> -(1 $\rightarrow$ )	4,66 [d 8,2 Hz]	3,94-3,90*	3,74-3,70*	3,94-3,91*	3,69-3,66*	n.b.	2,07
	102,7	53,2	71,7	68,4	75,7		23,0/ 175,7
( $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-1- <i>P</i> -( <i>O</i> $\rightarrow$ )	3,96-3,89* 4,14-4,08*	4,13-4,09*	3,84-3,80*	3,77-3,73*	3,64-3,59* 3,84-3,78*		
	65,7-65,6*	80,1	72,4	72,09	63,3		
Glycerol-(1 $\rightarrow$ )	3,45-3,42* 3,82-3,79*	3,97-3,93*	3,58-3,53* 3,69-3,65*				
	69,5	71,3	63,0				
$^{31}\text{P}$	$p^{\text{Rib-ol}}/6^{\text{C}} = 1,47$						

Tabelle 23: Die in der vorliegenden Arbeit aufgearbeiteten *S. pneumoniae* Stämme für den Serotyp 2, inklusive der Auswaagen für den Injektionspeak, Lipopeptide, LTA, Überstand nach Ultrazentrifuge, PGN-WTA nach Enzymbehandlung sowie nach Aufreinigung mit der P30 nach LytA-Behandlung.

Serotyp 2, <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39							
Mutante		Auswaagen [mg]					
		Injektionspeak	Lipopeptide	LTA	ÜS nach UZ PGN-WTA	PGN-WTA nach Enzymbehandlung	PGN-WTA nach LytA- Behandlung/ P30
	<b>WT</b>		1,762	6,551	1,47 g	80,292	15,165
	<b>cho<sup>-</sup>licA64</b>	16,226	2,028	6,246	2,82 g	21,02	
	<b>cho<sup>-</sup></b>	23,055	3,396	8,755			
<b>Unbekapselter Hintergrund (<math>\Delta cps</math>)</b>	<b><math>\Delta cps</math></b>	153,465	2,375	21,986	2,236 g	181,972	7,3
	<b><math>\Delta cps</math> (Quantifizierung A)</b>	72,359	0,701	4,812	102,598	43,46	
	<b><math>\Delta cps</math> (Quantifizierung B)</b>	61,134	1,414	5,004	968,086	58,59	
	<b><math>\Delta cps</math> (Quantifizierung C)</b>	44,609	0,545	6,783	457,245	135,19	
	<b><math>\Delta lgt</math></b>		4,857	10,97	467,59	62,187	24,07
	<b><math>\Delta lgt</math></b>	399,877		14,114	109,76	47,636	3,766
	<b><math>\Delta spd_{1672}</math></b>	4,746	0,805	0,695	1,191 g	217,423	7,714
	<b><math>\Delta spd_{1672}</math></b>	71,327	0,526	0,52	0,973	127,11	1,55
	<b><math>\Delta spd_{1672}::spd_{1672}</math></b>	41,839		12,582	978,25	0,715	
	<b><math>\Delta spd_{1672}::spd_{1672}</math></b>	86,46	1,411	3,592	238,474	75,995	9,545
	<b><math>\Delta spd_{1672}::spd_{1672}</math></b>		0,631	8,965			

Tabelle 24: Die in der vorliegenden Arbeit aufgearbeiteten *S. pneumoniae* Stämme für den Serotyp 4, inklusive der Auswaagen für den Injektionspeak, Lipopeptide, LTA, Überstand nach Ultrazentrifuge, PGN-WTA nach Enzymbehandlung sowie nach Aufreinigung mit der P30 nach LytA-Behandlung.

Serotyp 4, <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4							
Mutante		Auswaagen [mg]					
		Injektionspeak	Lipopeptide	LTA	ÜS nach UZ PGN-WTA	PGN-WTA nach Enzymbehandlung	PGN-WTA nach LytA- Behandlung/ P30
Unbekapselter Hintergrund ( $\Delta cps$ )	$\Delta cps$ (pH 6.5)		10,137	10,585	227,53	42,344	
	$\Delta cps$ (pH 7.4)		7,668	20,42	803,32	5,38	0,324
	$\Delta pce$		2,72	23,519	1,383	75,149	33,777
	$\Delta pce$		5,817	14,429	1,228	113,25	
	$\Delta pce$	146,241	4,658	17,58			
	$\Delta pce$	111,465	0,794	20,119			
	$\Delta licD2$	90,243		20,379	2,210 g	82,390	13,345
	$\Delta licD2$	205,614	0,737	13,273	626,141	36,013	
	$\Delta pce\Delta licD2$	93,325	0,190	13,351	1,036 g	93,7	
	$\Delta pce\Delta licD2$	100,809	0,367	11,773	103,27	50,77	
	$\Delta sp_{1893}$	58,339	0,364	0,277	793,92	147,5	9,475
	$\Delta sp_{1893}$		0,536	0,724	2,059 g	149,48	0,959
	$\Delta sp_{1893}::sp_{1893}$	29,02		4,4	1,319 g	96,331	11,421
	$\Delta sp_{1893}::sp_{1893}$	64,744	0,138	6,001	1,056 g	103,294	2,56

## 12. GC/MS Auswertung Quantifizierung

12.1 *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps – Unabhängige Kultur 1Tabelle 25: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps - unabhängige Kultur 1. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 25*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstellprobe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstellprobe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
Zellpellet	866,756	16,756	1,915	452,614	0,981	8136730	8769459	0,004
HIC Injektionspeak	72,359		2,404	30,099		3757314	4791389	0,002
HIC LTA	4,812		1,799	2,675		98808239	103448331	0,038
HIC Lipopeptide	0,701		0,37	1,895		/	/	/
Pellet UZ, SDS-frei	102,598	4,449	2,241	45,782	0,957	38064488	36867089	0,014
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	43,46		2,196	19,791	19,791	50902088	53211829	0,020

Tabelle 26: GC/MS-Quantifizierung von dem *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps – unabhängige Kultur 1. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von **Tabelle 24**.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge	Summe Menge [μg]	Korrigiere	Menge Ribitol	LTA/WTA Verhältnis [%]	Wieder- findungs- rate [%]
	Messung	Techn. Replikat	[μg] (siehe Formel 2)		Ribitol-Menge	[μg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)		
Zellpellet	33658462	33698207	0,011	14,335	6488,374	7,486	<b><u>16,17</u></b>	<b><u>35,11</u></b>
HIC Injektionspeak	21734032	22272757	0,007	9,223	277,610	0,314		
HIC LTA	276598036	281269629	0,086	123,522	330,399	0,374		
HIC Lipopeptide	2185597	/	0,001	1,093	2,071	0,002		
Pellet UZ, SDS-frei	143201792	147930242	0,045	59,282	2714,079	3,071		
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	225726273	234058333	0,071	90,490	1790,841	1,938		

Tabelle 27: GC/MS-Quantifizierung von dem *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps – unabhängige Kultur 2. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 27*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstell- probe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstell- probe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro- Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
Zellpellet	799,895	16,895	1,849	432,610	0,979	8085974	7719819	0,003
HIC Injektionspeak	61,134		3,205	19,075		8954427	8748466	0,004
HIC LTA	5,004		2,088	2,397		97628983	105422467	0,038
HIC Lipopeptide	1,414		1,044	1,354		8233598	8620279	0,004
Pellet UZ, SDS-frei	997,870	29,784	3,949	252,689	0,970	8580468	4812824	0,003
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	58,59		4,486	13,061		87583046	90311669	0,033

Tabelle 28: GC/MS-Quantifizierung von dem *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps – unabhängige Kultur 2. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von **Tabelle 26**.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge	Summe Menge [µg]	Korrigiere	Menge Ribitol	LTA/WTA Verhältnis [%]	Wieder- findungs- rate [%]
	Messung	Techn. Replikat	[µg] (siehe Formel 2)		Ribitol-Menge (siehe Formel 4)	[µg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)		
Zellpellet	37439905	38721559	0,012	15,483	6698,297	8,374	<u>17,7</u>	<u>38,5</u>
HIC Injektionspeak	20974792	20326820	0,007	10,487	200,031	0,245		
HIC LTA	438994016	472637703	0,140	177,905	426,358	0,522		
HIC Lipopeptide	37690763	37611330	0,012	15,544	21,053	0,026		
Pellet UZ, SDS-frei	53085756	35718928	0,014	16,979	4290,542	5,364		
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	401423164	403082717	0,124	156,868	2048,799	2,432		

Tabelle 29: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps - unabhängige Kultur 3. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 29*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstellprobe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstellprobe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
Zellpellet	889,895	9,894	2,023	439,889	0,989	9893817	9922701	0,004
HIC Injektionspeak	44,609		4,923	9,061		7479512	7072744	0,003
HIC LTA	6,783		2,08	3,261		140755965	148277296	0,053
HIC Lipopeptide	0,545		0,36	1,514		3775906	3361895	0,002
Pellet UZ, SDS-frei	457,245	18,245	1,493	306,259	0,960	9444468	9841422	0,004
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	135,19		3,233	41,816		80480653	77517068	0,029

Tabelle 30: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δcps - unabhängige Kultur 3. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von **Tabelle 28**.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge	Summe Menge [µg]	Korrigiere	Menge Ribitol	LTA/WTA Verhältnis [%]	Wieder- findungs- rate [%]
	Messung	Techn. Replikat	[µg] (siehe Formel 2)		Ribitol-Menge (siehe Formel 4)	[µg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)		
Zellpellet	47397602	48951425	0,015	19,314	8495,961	9,547	<b><u>21,1</u></b>	<b><u>49,9</u></b>
HIC Injektionspeak	20974792	20326820	0,007	21,041	190,661	0,212		
HIC LTA	438994016	472637703	0,140	260,988	851,097	0,956		
HIC Lipopeptide	37690763	37611330	0,012	6,799	10,294	0,011		
Pellet UZ, SDS-frei	53085756	35718928	0,014	17,495	5357,898	5,716		
PGN-WTA n. Enzymbehandl.	401423164	403082717	0,124	80,347	3359,746	3,584		

Tabelle 31: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39ΔcpsΔtacl - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe **Tabelle 31**.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstellprobe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstellprobe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
<b>Zellpellet</b>								
I			1,609	1303,294		2536318	2869766	
II	2097	12,928	2,71	773,801	0,994	4485999	4291990	0,002
<b>HIC LTA</b>								
I	/	/	/	/		/	/	/
II			/	/		/	/	
<b>Pellet UZ</b>								
I			1,311	908,841		2066394	2311984	
II	1191,49	20,688	1,263	943,381	0,983	2198881	2294509	0,001
<b>PGN-WTA</b>								
I			6,55	33,194		40153551	40722142	
II	217,423		4,948	43,942		45780034	45363628	0,016

Tabelle 32: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *tacl* - unabhängige Kultur 1. Fortsetzung von *Tabelle 30*.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge [ $\mu$ g] <i>(siehe Formel 2)</i>	Summe Menge [ $\mu$ g]	Korrigiere Ribitol-Menge <i>(siehe Formel 4)</i>	Menge Ribitol pro mg Zellpellet <i>(siehe Formel 6)</i>	LTA/WTA Verhältnis [%]
	Messung	Techn. Replikat					
<b>Zellpellet</b>							
I	30678116	33126177	0,014	15,376	20038,860	9,556	
II	54144693	53808141					
<b>HIC LTA</b>							
I	/	/	/	/	/	/	
II	/	/					/
<b>Pellet UZ</b>							
I	7822202	9044635	0,003	4,327	3932,778	1,864	
II	8236804	8880181					
<b>PGN-WTA</b>							
II	374170442	380069449	0,128	143,808	4773,618	2,223	
II	454777368	449399090					

Tabelle 33: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δ*cpsΔtacl* - unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 33*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstellprobe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstellprobe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
<b>Zellpellet</b>								
I	2750	21,999	3,366	816,993	0,992	10309054	11259252	0,004
II			2,402	1144,879		9607007	10120952	
<b>HIC LTA</b>								
I	/	/	/	/		/	/	/
II			/	/		/	/	
<b>Pellet UZ</b>								
I	972,59	11,858	4,084	238,146	0,988	14004745	15433994	0,005
II			2,172	447,785		9647150	11304313	
<b>PGN-WTA</b>								
I	127,11		1,719	73,944		46722487	44917811	0,018
II			1,817	69,956		45247928	51647958	

Tabelle 34: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39ΔcpsΔtacl - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von **Tabelle 32**.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge [µg] (siehe Formel 2)	Summe Menge [µg]	Korrigiere Ribitol-Menge (siehe Formel 4)	Menge Ribitol [µg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)	LTA/WTA Verhältnis [%]
	Messung	Techn. Replikat					
<b>Zellpellet</b>							
I	47503431	51752182	0,015	19,305	15772,195	5,735	
II	44473957	46865649					
<b>HIC LTA</b>							
I	/	/	/	/	/	/	
II	/	/					/
<b>Pellet UZ</b>							
I	66252371	73689545	0,018	23,070	5493,985	1,981	
II	40774206	48113192					
<b>PGN-WTA</b>							
I	179188045	175598469	0,059	76,307	5642,518	2,011	
II	190444957	212882027					

Tabelle 35: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39ΔcpsΔtacl pBAV1C-tacl - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 35*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstell- probe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstell- probe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
<b>Zellpellet</b>								
I	1298	11,613	2,208	587,862	0,991	13421313	12687152	0,007
II			3,497	371,175		20545369	21354549	
<b>HIC LTA</b>								
I	3,592		0,49	7,331		24152798	22795125	0,008
II			0,467	7,692		15555554	19082464	
<b>Pellet UZ</b>								
I	238,474	8,477	1,325	179,980	0,964	11876888	11785583	0,005
II			1,699	140,361		13202154	14482387	
<b>PGN-WTA</b>								
I	75,995		2,694	28,209		50991212	52367172	0,017
II			1,902	39,955		38015802	34758971	

Tabelle 36: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39Δ*cpsΔtacl* pBAV1C-*tacl* – unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von **Tabelle 34**.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge [µg] (siehe Formel 2)	Summe Menge [µg]	Korrigiere Ribitol-Menge (siehe Formel 4)	Menge Ribitol [µg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)	LTA/WTA Verhältnis [%]
	Messung	Techn. Replikat					
<b>Zellpellet</b>							
I	59278513	54499064	0,023	29,763	17496,724	13,480	
II	89183020	92116475					
<b>HIC LTA</b>							
I	98179062	95560058	0,027	35,102	257,318	0,196	<u><b>11,7</b></u>
II	70421962	84320901					
<b>Pellet UZ</b>							
I	49080314	49112534	0,014	19,174	3450,915		
II	38106315	40562886					
<b>PGN-WTA</b>							
I	198907480	218358565	0,055	71,758	2024,229	1,491	<u><b>88,3</b></u>
II	151054931	145276631					

Tabelle 37: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39ΔcpsΔtacl pBAV1C-tacl - unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe *Tabelle 37*.

Proben	Auswaage [mg]	Rückstell- probe [mg]	Eingesetzte Menge [mg]	Faktor (siehe Formel 3)	Faktor Rückstell- probe (siehe Formel 5)	Anhydro-Ribitol [1/1000]		Menge Anhydro-Ribitol [µg] (siehe Formel 1)
						Messung	Techn. Replikat	
<b>Zellpellet</b>								
I	2001	23,975	2,077	963,409	0,988	9528779	11090299	0,005
II			2,437	821,092		13271288	14244919	
<b>HIC LTA</b>								
I	8,965		1,565	5,728		73760567	84675236	0,029
II			1,449	6,187		76593690	78064687	
<b>Pellet UZ</b>								
I	346,61	12,628	2,887	120,059	0,964	40924211	40798383	0,013
II			1,558	222,471		25103228	26234035	
<b>PGN-WTA</b>								
I	152,630		1,851	82,458		36884501	41911685	0,016
II			2,092	72,959		43800437	45347354	

Tabelle 38: GC/MS-Quantifizierung für den *S. pneumoniae* Stamm D39ΔcpsΔtacl pBAV1C-tacl – unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von Tabelle 36.

Proben	Ribitol [1/1000]		Ribitol-Menge [µg] (siehe Formel 2)	Summe Menge [µg]	Korrigiere Ribitol-Menge (siehe Formel 4)	Menge Ribitol [µg] pro mg Zellpellet (siehe Formel 6)	LTA/WTA Verhältnis [%]
	Messung	Techn. Replikat					
<b>Zellpellet</b>							
I	44318175	49244729	0,017	22,144	21334,187	10,662	
II	61473359	64419171					
<b>HIC LTA</b>							
I	314339427	355890173	0,102	130,826	749,427	0,370	<u>11,4</u>
II	323534434	326579983					
<b>Pellet UZ</b>							
I	168013285	173167601	0,034	47,031	5646,542	2,686	
II	50035060	51329077					
<b>PGN-WTA</b>							
I	162810341	183602221	0,057	72,916	6012,535	2,861	<u>88,6</u>
II	190363145	201720584					

## 13. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Krankheitsbilder der von Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen.** Durch Tröpfcheninfektion gelangen Pneumokokken in den Nasenrachenraum. Von dort können sie über die Eustachische Röhre das Mittelohr erreichen und eine Sinusitis oder Otitis Media auslösen. Des Weiteren können sie über den respiratorischen Atmungstrakt über die Bronchien die Lunge erreichen, was zu einer Pneumonie führt. Ein Überwinden der Luft-Blut-Schranke und dem damit verbundenen Eindringen in das Blutssystem, kann zu einer Sepsis führen. Ein weiteres Überwinden der Blut-Hirn-Schranke löst dann eine Meningitis aus. Abbildung verändert nach [6]..... 10
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zelloberfläche von Pneumokokken inklusive der unterschiedlichen Zelloberflächenstrukturen wie die PGN-Schicht, Teichonsäuren und verschiedene Oberflächenproteine.** Zu den Oberflächenproteinen gehören nicht-klassische Proteine (z.B. Eno), Lipoproteine (LP) (z.B. MaIX), LPxTG-Proteine (z.B. SpuA) sowie Cholin-Bindeproteine (CBPs) (z.B. Pce). Verändert nach [17]..... 11
- Abbildung 3: Übersicht über die Zusammensetzung von verschiedenen CBPs, wobei lediglich eine Auswahl dargestellt ist.** N- bzw. C-terminale Cholin-Bindedomäne; Nicht-kanonische Sequenz, Nicht-kanonische Sequenz. Verändert nach [17]..... 13
- Abbildung 4: Übersicht über die fünf verschiedenen LTA-Typen.** Allen LTA-Typen gemeinsam ist die Verankerung über ein Glykolipid. Der Ankerzucker in den jeweiligen LTA-Typen ist in Rot dargestellt. An den jeweiligen LTA-Typen können zusätzlich weitere Reste, wie z.B. D-Alanin (siehe Typ I und IV), angebunden sein. An dem Glykolipidanker sind verschiedene Fettsäuren verestert (R), für *S. pneumoniae* sind dies z. B. Fettsäuren 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0 und 18:1. Abbildung verändert nach [29]..... 14
- Abbildung 5: Aktuelles Strukturmodell der Pneumokokken-LTA von *S. pneumoniae* [34].** Die LTA besteht aus repetitiven *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten mit der folgenden Struktur: (→4)-6-O-*P*-Cho-α-D-GalpNAc-(1→3)-6-O-*P*-Cho-β-D-GalpNAc-(1→1)-Rib-ol-5-P-(O→6)-β-D-Glcp-(1→3)-AATGalp(1→). Die Verknüpfung zum Glykolipidanker erfolgt über ein β-konfiguriertes AATGal an (→3)-α-D-Glcp-(1→3)-acyl<sub>2</sub>Gro [34]..... 15
- Abbildung 6: Vorgeschlagene Biosynthese der LTA und des PGN-WTA-Komplexes von *S. pneumoniae*.** Dargestellt sind Enzyme des Metabolismus (LicB, LicA, LicC) und der Anheftung (LicD1, LicD2) von Cholin, der Synthese und Polymerisation des Und-PP-*pseudo*-Pentasaccharid-Vorläufers (roter Kasten), sowie dessen Transports durch die Membran mittels TacF. Farbcode der Gene und Proteine für verschiedene Biosyntheseschritte: grau = Bildung des TA Vorläufers mit einer RU; pink = Biosynthese des Vorläufers; braun = Cholin-Aufnahme und -Metabolismus; grün = Anheftung des *P*-

Cho-Substituenten; rot = Polymerisation des Vorläufers; blau = Transport durch die Zellmembran; orange = Phosphotransferasen. ZM = Zytoplasmamembran. Verändert nach [39]. ..... 17

**Abbildung 7: Vergleich der LTA-Strukturen aus *S. pneumoniae* (A) und aus *S. oralis* Uo5 (B).** Die LTA aus *S. pneumoniae* setzt sich aus repetitiven *pseudo*-Pentasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen ( $\rightarrow 4$ )-6-O-*P*-Cho- $\alpha$ -D-GalpNAc-( $1 \rightarrow 3$ )-6-O-*P*-Cho- $\beta$ -D-GalpNAc-( $1 \rightarrow 1$ )-Rib-ol-5-P-(O-6)- $\beta$ -D-Glcp-( $1 \rightarrow 3$ )-AATGalp( $1 \rightarrow$ ). Die LTA-Struktur aus *S. oralis* setzt sich aus folgenden repetitiven *pseudo*-Tetrasaccharid-Einheiten zusammen: ( $\rightarrow 4$ )-[3,6-O-di-*P*-Cho]- $\beta$ -D-GalpNAc-( $1 \rightarrow 2$ )-Rib-ol-(1-P $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-( $1 \rightarrow 3$ )- $\beta$ -AATGalp( $1 \rightarrow$ ). Abbildung verändert nach [55]. ..... 20

**Abbildung 8: Struktur der de-O-acylierten LTA von *S. pneumoniae* inklusive der verwendeten Beschriftung für die verschiedenen *P*-Cho-Substituenten.** Nomenklatur basierend auf [34]. ..... 22

**Abbildung 9: Die Deletion der Gene *spd\_1672* bzw. *sp\_1893* bewirkt eine Abwesenheit der LTA.** Der Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) in einem Bereich von  $\delta_{\text{P}}$  3(-3) von der LTA aus dem *S. pneumoniae* D39 und TIGR4 Wildtyp (A, D), der Deletionsstämmen (B, E) sowie der Komplementationsstämmen (C, F). Dabei können die Signale folgenden chemischen Verschiebungen zugeordnet werden: Rib-ol-5-P  $\delta_{\text{P}} = 1,84$  ppm; *P*-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,33$  ppm; *P*-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,13$  ppm; *P*-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}} = -0,14$  ppm..... 24

**Abbildung 10: Die Deletion der Gene *spd\_1672* bzw. *sp\_1893* zeigt keinen Einfluss auf den PGN-WTA-Komplex.** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K, 283,54 MHz) in einem Bereich von  $\delta_{\text{P}}$  3(-3) des PGN-WTA-Komplexes von dem *S. pneumoniae* Stamm D39 und TIGR4 für den Wildtyp (A, D), der Deletionsstämmen (B, E) und der Komplementationsstämmen (C, F). Die Signale können folgenden chemischen Verschiebungen zugeordnet werden: Rib-ol-5-P  $\delta_{\text{P}} = 1,90$  ppm; *P*-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,33$  ppm; *P*-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,12$  ppm; *P*-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}} = -0,15$ ..... 25

**Abbildung 11: In zwei Mausmodellen zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zu den *TacL*-Deletionsstämmen ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate.** A) Pneumonie-Modell mit einer intranasalen Infektion mit  $\sim 2,5 \cdot 10^7$  biolumineszenz *S. pneumoniae* D39lux Wildtyp, D39lux $\Delta$ *tacL* und Komplementante D39 $\Delta$ *tacL* pBAV1C-*tacL* sowie das dazugehörige Biolumineszenzbild in Abbildung C. B) Sepsis-Modell mit einer intraperitonealen Infektion mit  $\sim 3 \cdot 10^3$  biolumineszenz D39lux Wildtyp, D39lux $\Delta$ *tacL* und der Komplementante D39 $\Delta$ *tacL* pBAV1C-*tacL*. ..... 28

**Abbildung 12: Die *Pce*-Deletion im *S. pneumoniae* Stamm TIGR4 bewirkt eine vollständige *P*-Cho-Substitution der LTA.** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_{\text{P}}$  3(-1);  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ *cps* (oberes Spektrum) mit der dazugehörigen Struktur und pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* (unteres Spektrum). Die Signale lassen sich wie folgt zu ordnen: Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}} = 1,89$  ppm; Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}} = 1,80$  ppm; *P*-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,33$  ppm; *P*-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}} = 0,13$  ppm; *P*-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}} = -0,15$  ppm. .... 29

**Abbildung 13: Das Massenspektrum des *Pce*-Deletionsstammes TIGR4 $\Delta$ *cps* $\Delta$ *pce* zeigt die Massen für eine vollständige *P*-Cho-Substitution der LTA.** Im Massenspektrum ist ein Bereich von 2500-9400 Da

dargestell. Dabei entsprechen die gemessenen molekularen Massen folgenden Kettenlängen: 5 RU = 6746,33 Da; 6 RU = 8044,77 Da; 7 RU = 9344,16 Da ..... 30

**Abbildung 14: Hydrolyse des terminalen P-Cho-Substituentens am  $\beta$ -D-GalpNAc führt zu Verschiebung des anomeren Protons H1 vom  $\alpha$ -D-GalpNAc.** Die Abbildung zeigt den Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren ( $\delta_{\text{H}}$  5,30-4,95;  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der de-O-acylierten pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ cps (oberes Spektrum) und der de-O-acylierten pnLTA aus TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce (unteres Spektrum). Die Signale lassen sich für die de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ cps wie folgt zu ordnen: E1<sub>P-Cho,  $\alpha$ -D-GalpNAc</sub>  $\delta_{\text{H}}$  = 5,15 ppm, H1<sub>P-Cho,  $\alpha$ -D-GalpNAc,term</sub>  $\delta_{\text{H}}$  = 5,07 ppm. Die Signale lassen sich für die de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce wie folgt zu ordnen: E1<sub>P-Cho,  $\alpha$ -D-GalpNAc</sub>  $\delta_{\text{H}}$  = 5,15 ppm; H1<sub>P-Cho,  $\alpha$ -D-GalpNAc,term</sub>  $\delta_{\text{H}}$  = 5,08 ppm..... 31

**Abbildung 15: In vitro Pce-Behandlung führt zur Hydrolyse der P-Cho-Substituenten P-Cho<sub>D+G</sub> und P-Cho<sub>H</sub>.**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (A) und Massenspektren (B) für die Pce-Behandlung von isolierter LTA aus dem Stamm TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce. **A)** Ausschnitt von den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren  $\delta_{\text{P}}$  3-(-1)  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz. Dabei entsprechen die Signale folgenden chemischen Verschiebungen: Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 1,89 ppm; Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 1,80 ppm; P-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 0,33 ppm; P-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 0,13 ppm; P-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = -0,15 ppm. **B)** Bei den Massenspektren ist ein Bereich von 4500-8000 Da gezeigt. Jeder Stern mit der dazugehörigen blauen Linie repräsentiert die Hydrolyse von einem P-Cho-Substituenten und dementsprechend einem Massenverlust von -165 Da. Die dazugehörigen berechneten Massen sind in **Tabelle 5** aufgelistet. Die Pce-Behandlung erfolgte in 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  bei einem pH-Wert von 8,0 für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C..... 34

**Abbildung 16: Die in vitro Pce-Behandlung bei einem pH-Wert von 8,0 führt zu einer effektiveren Hydrolyse des P-Cho<sub>H</sub>-Substituenten.** Ausschnitt von den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren  $\delta_{\text{P}}$  3-(-1)  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz. Die Signale lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 1,89 ppm; Rib-ol-5-P<sub>C</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 1,80 ppm; P-Cho<sub>D+G</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 0,33 ppm; P-Cho<sub>H</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = 0,13 ppm; P-Cho<sub>E</sub>  $\delta_{\text{P}}$  = -0,15 ppm. Die Pce-Behandlung erfolgte in 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  bei einem pH-Wert von 8,0 für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C. An dieser Stelle wurden zwei Pce Konzentrationen (80  $\mu\text{g}$  Pce/mg LTA; 160  $\mu\text{g}$  Pce/mg LTA) analysiert... 36

**Abbildung 17: Aufnahme und Metabolismus von Cholin sowie die Anheftung der Phosphorylcholine (P-Cho) an D-GalpNAc durch LicD1 und LicD2.** *S. pneumoniae* ist auf die Anwesenheit von exogenem Cholin angewiesen, das es mittels LicB aufnimmt und mit Hilfe von LicA und LicC metabolisiert. Im Anschluss wird CTP-aktiviertes Phosphorylcholine durch die Enzyme LicD1 und LicD2 auf  $\alpha$ -/ $\beta$ -D-GalpNAc übertragen. Bild modifiziert von [39]. ..... 38

**Abbildung 18: Strukturbeweis für die spezifische P-Cho-Anheftung am  $\beta$ -D-GalpNAc katalysiert durch LicD2 sowie Untersuchungen für eine anschließende Pce induzierte Hydrolyse.** Die Abbildung zeigt das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (A), die dazugehörigen Massenspektren (B) von *S. pneumoniae*

TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2 (obere Spektren), TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2 (mittlere Spektren) und TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2 mit 160  $\mu$ g Pce /mg isolierte LTA Pce-Behandlung (untere Spektren). (A) Zeigt einen Ausschnitt ( $\delta_P$  3(-1) ppm) aus den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz). Die Signale lassen sie wie folgt zuordnen: Rib-ol-5- $\text{P}_C$   $\delta_P = 1,88$  ppm; Rib-ol-5- $\text{P}_C$   $\delta_P = 1,79$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (Terminus;  $\text{P-Cho}_H$ )  $\delta_{\text{P-Cho}_H} = 0,11$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc (RU;  $\text{P-Cho}_D$ )  $\delta_{\text{P-Cho}_E} = -0,16$  ppm. (B) Ausschnitt aus den Massenspektren von 5400-9300 Da. Die Signale lassen sich wie folgt zu ordnen: 5921,06 Da entsprechen 5 RU; 7054,44 Da entsprechen 6 RU; 8187,83 Da entsprechen 7 RU; 9322,22 Da entsprechen 7 RU. ( $n = 2$ )..... 40

**Abbildung 19: Strukturbeweis für die spezifische P-Cho-Anheftung am  $\beta$ -D-GalpNAc katalysiert durch LicD2 für den PGN-WTA-Komplex.**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_P$  3(-3);  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) des PGN-WTA-Komplexes aus den Stämmen TIGR4 $\Delta$ cps (oberes Spektrum), TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ licD2 (mittleres Spektrum) und vom TIGR4 $\Delta$ cps $\Delta$ pce $\Delta$ licD2 (unteres Spektrum). Die Signale können wie folgt zugeordnet werden: Rib-ol-5- $\text{P}_C$   $\delta_P = 1,92$  ppm;  $\beta$ -D-GalpNAc ( $\text{P-Cho}_{D+G}$ )  $\delta_{\text{P-Cho}_{D+G}} = 0,33$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc ( $\text{P-Cho}_H$ )  $\delta_{\text{P-Cho}_H} = 0,11$  ppm;  $\alpha$ -D-GalpNAc ( $\text{P-Cho}_E$ )  $\delta_{\text{P-Cho}_D} = -0,16$  ppm. .... 42

**Abbildung 20: Vergleich des licD3-Genlokus in *S. pneumoniae* R6Cho $^-$  (oberer Bereich) mit dem des *S. pneumoniae* R6 Wildtyp-Stammes (unterer Bereich).** Die *S. pneumoniae* R6 Gene sind mit grauen Pfeilen und die aus dem *S. oralis* stammenden Gene mit schwarzen Pfeilen sowie der Abkürzung Sor gekennzeichnet. Verändert nach [77]..... 44

**Abbildung 21: Massenspektrum (Bereich von 5000-9500 Da, gemessen mit einer Kollisionsenergie von 5 V) der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho $^-$ .** Der Massenverlust von -165 Da, was jeweils einem P-Cho-Substituenten entspricht, ist mit einem Stern gekennzeichnet. .. 48

**Abbildung 22: Die Integration des licD3-Genlokus von dem *S. oralis* Stamm ATCC 35037 in den *S. pneumoniae* Stamm D39 führt zu einem veränderten P-Cho-Substitutionsmuster.** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_P$  3(-3);  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) für die LTA aus D39 $\Delta$ cps (oberes Spektrum) und für die LTA aus D39Cho $^-$  (unteres Spektrum). Die Signale für die de-O-acylierte LTA aus D39 $\Delta$ cps lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol- $\text{P}_C$   $\delta_P = 1,89$  ppm; Rib-ol-5- $\text{P}_C$   $\delta_P = 1,80$  ppm;  $\text{P-Cho}_{D+G}$   $\delta_P = 0,33$  ppm;  $\text{P-Cho}_H$   $\delta_P = 0,13$  ppm;  $\text{P-Cho}_E$   $\delta_P = -0,15$  ppm. .... 48

**Abbildung 23: Wasserunterdrücktes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\delta_H$  6-0;  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der de-O-acylierten LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho $^-$ .** Im Ausschnitt ist der Bereich anomerer Protonen von  $\delta_H$  5,0-4,3 ppm dargestellt inklusive der Zuordnung der einzelnen Signale. .... 49

**Abbildung 24: Struktur für die de-O-acylierte LTA aus dem *S. pneumoniae* Stamm D39Cho $^-$ .** Die LTA des *S. pneumoniae* Stammes D39Cho $^-$  setzt sich aus repetitiven pseudo-Tetrasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen: ( $\rightarrow$ 4)-[3,6-O-di-P-Cho]- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-(1-P $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGal-(1 $\rightarrow$ )..... 51

**Abbildung 25: Zusätzliche LicA-Deletion im *S. pneumoniae* Stamm D39Cho $^-$  führt zu einer LTA ohne P-Cho-Substituenten.** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren ( $\delta_P$  3(-3),  $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 K; 283,54 MHz) der de-O-

acylierten LTA aus den Stämmen D39Cho <sup>-</sup> (oberes Spektrum) und D39Cho <sup>-</sup> licA64 (unteres Spektrum). Die Signale für die de- <i>O</i> -acylierte LTA aus D39Cho <sup>-</sup> lassen sich zu folgenden chemischen Verschiebungen zuordnen: Rib-ol- <i>P</i> $\delta_P = 1,48$ ppm; <i>P</i> -Cho <sub>D,term</sub> ( <i>O</i> -6) $\delta_P = 0,27$ ppm; <i>P</i> -Cho <sub>D</sub> ( <i>O</i> -6) $\delta_P = 0,20$ ppm; <i>P</i> -Cho <sub>D,term</sub> ( <i>O</i> -3) $\delta_P = -0,78$ ppm; <i>P</i> -Cho <sub>D</sub> ( <i>O</i> -3) $\delta_P = -1,08$ ppm. Das <sup>31</sup> P-NMR-Spektrum der LTA von D39Cho <sup>-</sup> licA64 enthält lediglich das Rib-ol-Phosphat-Signal bei 1,47 ppm.....	53
<b>Abbildung 26: Massenspektrum (Bereich 5250-11500 Da, gemessen mit einer Kollisionsenergie von 5 V) der de-<i>O</i>-acylierten LTA aus dem Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64.</b> *Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak, **dritten Isotopenpeak, ***fünften Isotopenpeak.....	53
<b>Abbildung 27: Ausschnitt des wasserunterdrückten <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (D<sub>2</sub>O; 300 K; 283,54 MHz) sowie die Zuordnung der Signale im anomeren Bereich von der isolierten LTA aus D39Cho<sup>-</sup>licA64.</b> Das <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum zeigt einen Ausschnitt von $\delta_H$ 5,50-0,00. Im Kasten ist der anomere Bereich von $\delta_H$ 5,00-4,45 dargestellt.....	54
<b>Abbildung 28: Struktur für die de-<i>O</i>-acylierte LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64.</b> Die LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho <sup>-</sup> licA64 setzt sich aus repetitiven <i>pseudo</i> -Tetrasaccharid-Einheiten folgender Struktur zusammen: ( $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-Rib-ol-(1- <i>P</i> $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -AATGal-(1 $\rightarrow$ ).....	55
<b>Abbildung 30: Massenspektren (Bereich von 4000-10000 Da, gemessen bei einer Kollisionsenergie von 15 V) für die RP-18-HPLC von dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>lgt.</b> Der Gradient sowie das dazugehörige Chromatogramm sind in der <b>Abbildung 29</b> dargestellt. ....	59
<b>Abbildung 31: Trennung der de-<i>O</i>-acylierten LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>pce mittels HPAEC-PAD.</b> Neutrales System, Laufmittel A: H <sub>2</sub> O, Laufmittel B: NaAc (pH 6). <b>A+B</b> ) Verwendeter Gradient im analytischen Maßstab im nahezu neutralen pH-Wert. <b>C</b> ) <b>Abbildung C</b> zeigt das dazugehörige Chromatogramm.....	60
<b>Abbildung 34: Gradientenoptimierung für die chromatographische Trennung der LTA des Stammes TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>pce<math>\Delta</math>licD2 mittels HPAEC-PAD.</b> <b>(A-L)</b> Alkalisches System, Laufmittel A: 0,1 M NaOH, Laufmittel B: 1 M Na-Acetat + 0,1 M NaOH; <b>(A-C)</b> Methode V; <b>(D-F)</b> Methode II; <b>(G-I)</b> Methode VI; <b>(J-L)</b> Methode VII. Methoden beschrieben in <b>Kapitel 9.4.9.2</b> . In grün dargestellt sind die %-Werte des Gradienten.....	64
<b>Abbildung 36: Struktur der TA von <i>S. pneumoniae</i>, wobei das Ribitol-5-Phosphat rot hervorgehoben ist.....</b>	67
<b>Abbildung 38: Vergleich der verschiedenen Hydrolyse-Bedingungen von isolierter LTA aus <i>S. pneumoniae</i> D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>lgt mit Zuordnung ausgewählter Signale.</b> GC-Chromatogramm nach Hydrolyse mit <b>A</b> ) 4 M HCl für 4 h bei 100 °C, <b>B</b> ) 4 M TFA für 4 h bei 100 °C, <b>C</b> ) 4 M HCl über Nacht bei 100 °C, <b>D</b> ) 4 M TFA über Nacht bei 100 °C.....	69

<b>Abbildung 39: Schema für die Aufarbeitung des Zellmaterials für die Isolierung von LTA und WTA.</b> Zu ausgewählten Zeitpunkten während der Aufarbeitung wurden Rückstellproben für die Quantifizierung entnommen, hervorgehoben mit einem grünen Kasten. ....	70
<b>Abbildung 41: Aufarbeitungsschema für die TA von <i>S. pneumoniae</i>.</b> In grünen Kästen dargestellt sind die Zeitpunkte, an denen Proben für die Quantifizierung entnommen wurden. Weiterhin sind an den entsprechenden Stellen die jeweiligen Formeln für die Berechnung dargestellt.....	72
<b>Abbildung 41: Aufarbeitungsschema für LTA und WTA, inklusive der Kapitel für die einzelnen Aufarbeitungsprozesse.</b> Extraktion und Isolation von der LTA ist im linken Schema (Aufarbeitung LTA) dargestellt. Die Aufarbeitung des PGN-WTA Komplexes ist im rechten Schema verdeutlicht (Aufarbeitung WTA).....	84
<b>Abbildung 42: Exemplarisches HIC-Chromatogramm inklusive dem dazugehörigen normierten Phosphattest für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Δ<i>cps</i> für die Fraktionen #20-40.</b> ....	87
<b>Abbildung 43: Beispielhaftes Chromatogramm für die P10 für die Trennung von de-O-acylierte LTA von Salzen nach Hydrazin-Behandlung.</b> Die Abbildung zeigt das Chromatogramm für die LTA von den <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> .....	88
<b>Abbildung 44: Isolierung des PGN-WTA-Komplexes mit den Enzym-Zugaben, den verschiedenen Inkubations- und Zentrifugationsschritten. Aufarbeitung verändert nach [18].</b> ....	89
<b>Abbildung 45: Hydrolyse der PGN-WTA-Schicht durch LytA sowie die anschließend Trennung mittels GPC P30-Säule mit den vereinten Fraktionen für den PGN-WTA-Komplex, den Tripeptiden und Dipeptiden aus der PGN-Schicht. (A)</b> Abbildung A zeigt die Hydrolyse der LytA zwischen MurNAc und Alanin der Peptidoglykanschicht, dargestellt durch einen schwarzen Pfeil. Zusätzlich ist die Anbindung der WTA über ein Phosphat an MurNAc dargestellt. <b>(B)</b> Trennung mittels P30 des PGN-WTA-Komplexes von <i>S. pneumoniae</i> D39Δ <i>cps</i> Δ <i>lgt</i> mit der P30 nach der LytA-Behandlung. MurNAc – N-Acetylmuraminsäure, GlcNAc – N-Acetylglukosaminsäure, PGN – Peptidoglykan.....	91
<b>Abbildung 46: Struktur für de-O-acylierte LTA von dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i> inklusive der Nomenklatur für die verschiedenen Zucker basierend auf [34].</b> ....	99
<b>Abbildung 47: <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-dept-Spektrum (D<sub>2</sub>O; 300 K; 700 MHz; δ<sub>H</sub> 5,24-3,19; δ<sub>C</sub> 107-46) für de-O-acylierte LTA aus <i>S. pneumoniae</i> TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i> inklusive der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern.</b> Nomenklatur basiert auf [34] und ist der Struktur in der <b>Abbildung 46</b> zuzuordnen. Die <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C und <sup>31</sup> P chemischen Verschiebungen sind in der <b>Tabelle 17</b> aufgelistet. ....	99
<b>Abbildung 48: Struktur für de-O-acylierte LTA aus den <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>licD2</i> inklusive der Nomenklatur der verschiedenen Zucker basierend auf [34].</b> ....	101
<b>Abbildung 49: <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-dept-Spektrum (D<sub>2</sub>O; 300 K; 700 MHz; δ<sub>H</sub> 5,20-3,10; δ<sub>C</sub> 108-46) für die de-O-acylierte LTA aus <i>S. pneumoniae</i> TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>licD2</i> mit der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern.</b> Die Nomenklatur sowie die Zuordnung zu einzelnen Zuckern kann der <b>Abbildung 48</b>	

---

entnommen werden. Die $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ und $^{31}\text{P}$ chemischen Verschiebungen sind in der <b>Tabelle 18</b> aufgelistet.....	101
<b>Abbildung 50: <i>S. pneumoniae</i> Struktur für de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>pce<math>\Delta</math>licD2 inklusive der Zuordnung der Zucker. Die Nomenklatur der Zucker erfolgte anlehnend an[34]. .....</b>	<b>103</b>
<b>Abbildung 51: <math>^1\text{H}</math>,<math>^{13}\text{C}</math>-HSQC-dept-Spektrum (<math>\text{D}_2\text{O}</math>; 300 K; 700 MHz; <math>\delta_{\text{H}}</math> 5,15-3,15; <math>\delta_{\text{C}}</math> 111-44) mit der Zuordnung zu den verschiedenen Zuckern für die de-O-acylierte LTA aus <i>S. pneumoniae</i> TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>pce<math>\Delta</math>licD2. Die Nomenklatur der einzelnen Zucker kann der <b>Abbildung 50</b> und die einzelnen <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math> und <math>^{31}\text{P}</math> chemischen Verschiebungen sind in der <b>Tabelle 19</b> aufgelistet. ....</b>	<b>103</b>
<b>Abbildung 52: Struktur für die de-O-acylierte LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho<sup>-</sup> inklusive der Nomenklatur der Zucker.....</b>	<b>105</b>
<b>Abbildung 53: <math>^1\text{H}</math>,<math>^{13}\text{C}</math>-HSQC-dept-Spektrum (<math>\text{D}_2\text{O}</math>; 300 K; 700 MHz; <math>\delta_{\text{H}}</math> 5,00-3,15; <math>\delta_{\text{C}}</math> 107-49) für die de-O-acylierte LTA aus <i>S. pneumoniae</i> D39Cho<sup>-</sup> mit der Zuordnung der verschiedenen Zuckern anlehnend an <b>Abbildung 52</b>. Die <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math> und <math>^{31}\text{P}</math> chemischen Verschiebungen sind in der <b>Tabelle 20</b> aufgelistet.....</b>	<b>105</b>
<b>Abbildung 54: <i>S. pneumoniae</i> der de-O-acylierten LTA für den Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64 inklusive der Nomenklatur der verschiedenen Zucker. ....</b>	<b>107</b>

## 14. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Verwendete <i>S. pneumoniae</i> Stämme aus denen die LTA isoliert wurde.</b> .....	23
<b>Tabelle 2: Vergleich der berechneten und gemessenen molekularen Massen sowie die Massengenauigkeit für die de-O-acylierte LTA aus dem Stamm TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i>.</b> *Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak.....	30
<b>Tabelle 3: Integrale aus den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren für Ribitol-Phosphat und die spezifischen Phosphatgruppen der LTA von den Stämmen TIGR4Δ<i>cps</i> und TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i></b> *Die Integrale für TIGR4Δ <i>cps</i> stammen aus [34].....	31
<b>Tabelle 4: Integrale aus den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren für Ribitol-Phosphat und die spezifischen Phosphatgruppen der LTA des Stammes TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i> sowie für die P<i>ce</i> induzierte Hydrolyse.</b> Die P <i>ce</i> -Behandlungen erfolgte bei den Konzentrationen von 80, 120 und 160 μg P <i>ce</i> /mg LTA und bei einem pH-Wert von 7,4. Für die Integration diente das Ribitol-Phosphat (Rib-P <sub>C</sub> /Rib-P <sub>C</sub> ) von der de-O-acylierten LTA aus dem Stamm TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> als Referenzwert. Dafür erfolgten zwei unabhängige Messungen von der de-O-acylierten LTA von TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> . Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wieder.....	32
<b>Tabelle 5: Monoisotopenpeaks für die P<i>ce</i> induzierte Hydrolyse der P-Cho-Substituenten. Beispielhaft gezeigt für 6 RU und einer P<i>ce</i>-Behandlung bei einer Konzentration von 80 μg P<i>ce</i>/mg LTA.</b> .....	35
<b>Tabelle 6: Integrale für Ribitol-Phosphat und für die spezifischen Phosphatgruppen der LTA des Stammes TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i> sowie für die P<i>ce</i> induzierte Hydrolyse.</b> Die P <i>ce</i> -Behandlung erfolgte bei den Konzentrationen von 80 und 160 μg P <i>ce</i> /mg LTA für 24 h bei 37 °C in 50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,0). Für die Integration der verschiedenen Phosphat-Signale diente das Ribitol-Phosphat (Rib-P <sub>C</sub> /Rib-P <sub>C</sub> ) von der de-O-acylierten LTA vom TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> als Referenzwert. Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wider. n.b. = nicht bestimmbar .....	36
<b>Tabelle 7: Integrale für die spezifischen Phosphatgruppen-Signale im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der LTA aus dem P<i>ce</i>-Deletionsstamm, den LicD2-Deletionsstämmen sowie für die P<i>ce</i>-Behandlung.</b> Die P <i>ce</i> -Behandlung erfolgte bei einer Konzentration von 160 μg P <i>ce</i> / mg LTA bei einem pH-Wert von 7,4. Für die Integration der Phosphat-Signale diente das Ribitol-Phosphat (Rib-P <sub>C</sub> /Rib-P <sub>C</sub> ) von der de-O-acylierten LTA vom TIGR4Δ <i>cps</i> Δ <i>pce</i> als Referenzwert. Die Integrale spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung wider. n.b. = nicht bestimmbar .....	39
<b>Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen für die de-O-acylierten LTA aus den <i>S. pneumoniae</i> Stämmen TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>pce</i>Δ<i>licD2</i> und TIGR4Δ<i>cps</i>Δ<i>licD2</i>, inklusive für die P<i>ce</i>-</b>	

<b>Behandlung von TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>licD2.</b> *Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak bzw. ** dem dritten Isotopenpeak. ....	41
<b>Tabelle 9: Zuordnung der Gene aus der Abbildung 20 aus dem licD3-Genlocus aus dem S. pneumoniae Stamm R6Cho<sup>-</sup>, den zugehörigen Proteinen sowie deren entsprechende Funktionen in der LTA-Biosynthese des S. oralis aus dem Stamm Uo5.</b> ....	45
<b>Tabelle 10: Gegenüberstellung der berechneten und der gemessenen Massen sowie die ermittelte Massengenauigkeit für die verschiedenen Kettenlängen von der de-O-acylierten LTA von D39Cho<sup>-</sup>.</b> * = Masse des zweiten Isotopenpeaks.....	51
<b>Tabelle 11: Gegenüberstellung der berechneten und der gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit für die verschiedenen Kettenlängen der de-O-acylierten LTA aus dem S. pneumoniae Stamm D39Cho<sup>-</sup>licA64.</b> *Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak; **dritter Isotopenpeak, ***fünfter Isotopenpeak. ....	55
<b>Tabelle 12: Vergleich der berechneten und gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit der unterschiedlichen Pools nach HAPEC-PAD.</b> ....	63
<b>Tabelle 13: Vergleich der berechneten und gemessenen Massen sowie die Massengenauigkeit für die unterschiedlichen Pools nach der Trennung mit der Anionen-Austausch-Chromatographie.</b> *Gekennzeichnete berechnete und gemessene Massen entsprechen dem zweiten Isotopenpeak....	66
<b>Tabelle 14: Vergleich des LTA zu WTA Verhältnisses vor der Enzymbehandlung und nach der Enzymbehandlung des PGN-WTA-Komplexes.</b> .....	73
<b>Tabelle 15: Vergleich der Ribitol-Menge [µg] pro mg Zellpellet inklusive dem Mittelwert (Ø) und der Standardabweichung (±SD) für LTA und WTA aus den Stämmen D39<math>\Delta</math>cps, D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl und D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl pBAV1C-tacl.</b> ....	75
<b>Tabelle 16: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten S. pneumoniae Stämme.</b> .....	83
<b>Tabelle 17: Zusammensetzung der Lösungsmittel für die Bestimmung des Phosphatgehaltes.</b> .....	86
<b>Tabelle 18: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P chemische Verschiebungen für die de-O-acylierte LTA aus dem S. pneumoniae Stamm TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>pce.</b> Die dazugehörige Struktur ist in <b>Abbildung 46</b> und das entsprechende <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC-dept-Spektrum ist in <b>Abbildung 47</b> dargestellt. Die <sup>13</sup> C chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. * nicht aufgelöstes Multiplet, <sup>§</sup> Zuordnung erfolgte unter zu Hilfe von [34] .....	100
<b>Tabelle 19: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P chemische Verschiebungen für die de-O-acylierte LTA aus dem S. pneumoniae Stamm TIGR4<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>licD2.</b> Die dazugehörige Struktur ist in <b>Abbildung 48</b> und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in <b>Abbildung 49</b> dargestellt. Die <sup>13</sup> C chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. * nicht aufgelöstes Multiplet .....	102

<b>Tabelle 20:</b> $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$ chemische Verschiebungen für die de- <i>O</i> -acylierte LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm TIGR4 $\Delta\text{cps}\Delta\text{pce}\Delta\text{licD2}$ . Die dazugehörige Struktur ist in <b>Abbildung 50</b> und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in <b>Abbildung 51</b> dargestellt. Die $^{13}\text{C}$ chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. * nicht aufgelöstes Multiplet	104
<b>Tabelle 21:</b> $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$ chemische Verschiebungen für die de- <i>O</i> -acylierte LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho $^-$ . Die dazugehörige Struktur ist in <b>Abbildung 52</b> und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in <b>Abbildung 53</b> dargestellt. Die $^{13}\text{C}$ chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. * nicht aufgelöstes Multiplet, <sup>§</sup> Bestimmung erfolgte bei 295 K	106
<b>Tabelle 22:</b> $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$ chemische Verschiebungen für die de- <i>O</i> -acylierte LTA aus dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39Cho $^-$ licA64. Die dazugehörige Struktur ist in <b>Abbildung 54</b> und das entsprechende HSQC-dept-Spektrum ist in <b>Abbildung 55</b> dargestellt. Die $^{13}\text{C}$ chemischen Verschiebungen sind kursiv hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbare chemische Verschiebungen. * nicht aufgelöstes Multiplet	108
<b>Tabelle 23:</b> Die in der vorliegenden Arbeit aufgearbeiteten <i>S. pneumoniae</i> Stämme für den Serotyp 2, inklusive der Auswaagen für den Injektionspeak, Lipopeptide, LTA, Überstand nach Ultrazentrifuge, PGN-WTA nach Enzymbehandlung sowie nach Aufreinigung mit der P30 nach LytA-Behandlung.	109
<b>Tabelle 24:</b> Die in der vorliegenden Arbeit aufgearbeiteten <i>S. pneumoniae</i> Stämme für den Serotyp 4, inklusive der Auswaagen für den Injektionspeak, Lipopeptide, LTA, Überstand nach Ultrazentrifuge, PGN-WTA nach Enzymbehandlung sowie nach Aufreinigung mit der P30 nach LytA-Behandlung.	110
<b>Tabelle 25:</b> GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ - unabhängige Kultur 1. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe <b>Tabelle 25</b> .	111
<b>Tabelle 26:</b> GC/MS-Quantifizierung von dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ – unabhängige Kultur 1. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von <b>Tabelle 24</b> .	112
<b>Tabelle 27:</b> GC/MS-Quantifizierung von dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ – unabhängige Kultur 2. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe <b>Tabelle 27</b> .	113
<b>Tabelle 28:</b> GC/MS-Quantifizierung von dem <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ – unabhängige Kultur 2. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von <b>Tabelle 26</b> .	114
<b>Tabelle 29:</b> GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ - unabhängige Kultur 3. Tabelle-Teil 1, Fortsetzung siehe <b>Tabelle 29</b> .	115
<b>Tabelle 30:</b> GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 $\Delta\text{cps}$ - unabhängige Kultur 3. Tabelle-Teil 2, Fortsetzung von <b>Tabelle 28</b> .	116

---

<b>Tabelle 31: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe Tabelle 31.</b> .....	117
<b>Tabelle 32: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl - unabhängige Kultur 1. Fortsetzung von Tabelle 30.</b> .....	118
<b>Tabelle 33: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl - unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe Tabelle 33.</b> .....	119
<b>Tabelle 34: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von Tabelle 32.</b> .....	120
<b>Tabelle 35: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl pBAV1C-tacL - unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe Tabelle 35.</b> .....	121
<b>Tabelle 36: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl pBAV1C-tacL – unabhängige Kultur 1. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von Tabelle 34.</b> .....	122
<b>Tabelle 37: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl pBAV1C-tacL - unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 1, Fortsetzung siehe Tabelle 37.</b> .....	123
<b>Tabelle 38: GC/MS-Quantifizierung für den <i>S. pneumoniae</i> Stamm D39<math>\Delta</math>cps<math>\Delta</math>tacl pBAV1C-tacL – unabhängige Kultur 2. Tabelle – Teil 2, Fortsetzung von Tabelle 36.</b> .....	124

## 15. Quellenverzeichnis

1. Watson, D.A., et al., *A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery*. Clin Infect Dis, 1993. **17**(5): p. 913-24.
2. Austrian, R., *Pneumococcus: the first one hundred years*. Rev. Infect. Dis., 1981. **3**: p. 183-9.
3. van der Poll, T. and S.M. Opal, *Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia*. Lancet, 2009. **374**(9700): p. 1543-56.
4. Lynch, J.P., 3rd and G.G. Zhanel, *Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines*. Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(3): p. 217-25.
5. Gehanno, P., et al., *Pathogens isolated during treatment failures in otitis*. Pediatr Infect Dis J, 1998. **17**(10): p. 885-90.
6. Henriques-Normark, B. and E.I. Tuomanen, *The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(7).
7. Loda, F.A., et al., *Occurrence of Diplococcus pneumoniae in the upper respiratory tract of children*. J Pediatr, 1975. **87**(6 Pt 2): p. 1087-93.
8. Boulnois, G.J., *Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(2): p. 249-59.
9. Cartwright, K., *Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management*. Eur J Pediatr, 2002. **161**(4): p. 188-95.
10. Brent, A.J., et al., *Pneumococcal conjugate vaccines for childhood immunization*. WHO, 2007. **82**: p. 93-107.
11. Rodgers, G.L., et al., *Global serotype distribution among Streptococcus pneumoniae isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines*. Vaccine, 2009. **27**(29): p. 3802-10.
12. Song, J.Y., M.H. Nahm, and M.A. Moseley, *Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance*. J Korean Med Sci, 2013. **28**(1): p. 4-15.
13. Weinberger, D.M., et al., *Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(6): p. 692-9.
14. Watson, D.A., D.M. Musher, and J. Verhoef, *Pneumococcal Virulence Factors and Host Immune Responses to Them*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1995. **14**(6): p. 479-90.
15. Mitchell, A.M. and T.J. Mitchell, *Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(5): p. 411-8.
16. McGee, L., et al., *Antibiotic Resistance of Pneumococci*, in *Streptococcus pneumoniae: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions*, J.S. Brown, S. Hammerschmidt, and C.J. Orihuela, Editors. 2015, Elsevier: UK.
17. Pérez-Dorado, I., S. Galan-Bartual, and J.A. Hermoso, *Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts*. Mol Oral Microbiol, 2012. **27**(4): p. 221-45.
18. Bui, N.K., et al., *Isolation and analysis of cell wall components from Streptococcus pneumoniae*. Anal Biochem, 2012. **421**(2): p. 657-66.
19. Garcia-Bustos, J.F. and A. Tomasz, *Structure of the Peptide Network of Pneumococcal Peptidoglycan*. J Bacteriol, 1987. **169**(2): p. 447-53.
20. Filipe, S.R. and A. Tomasz, *Inhibition of the expression of penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae by inactivation of cell wall muropeptide branching genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4891-6.
21. Weidenmaier, C. and A. Peschel, *Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 276-87.

22. Neuhaus, F.C. and J. Baddiley, *A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 686-723.
23. Bergmann, S. and S. Hammerschmidt, *Versatility of pneumococcal surface proteins*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 295-303.
24. Hoskins, J., et al., *Genome of the bacterium Streptococcus pneumoniae strain R6*. J Bacteriol, 2001. **183**(19): p. 5709-17.
25. Gosink, K.K., et al., *Role of novel choline binding proteins in virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5690-5.
26. Hermoso, J.A., et al., *Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): p. 533-8.
27. Baddiley, J., *Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria*. Essays Biochem, 1972. **8**: p. 35-77.
28. Armstrong, J.J., et al., *Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls*. Nature, 1959. **184**: p. 247-8.
29. Percy, M.G. and A. Gründling, *Lipoteichoic acid synthesis and function in Gram-positive bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2014. **68**: p. 81-100.
30. Percy, M.G., et al., *Identification of a Lipoteichoic Acid Glycosyltransferase Enzyme Reveals that GW-Domain-Containing Proteins Can Be Retained in the Cell Wall of Listeria monocytogenes in the Absence of Lipoteichoic Acid or Its Modifications*. J Bacteriol, 2016. **198**(15): p. 2029-42.
31. Hether, N.W. and L.L. Jackson, *Lipoteichoic acid from Listeria monocytogenes*. J Bacteriol, 1983. **156**(2): p. 809-17.
32. Campeotto, I., et al., *Structural and Mechanistic Insight into the Listeria monocytogenes Two-enzyme Lipoteichoic Acid Synthesis System*. Journal of biological chemistry, 2014. **289**: p. 28054-28069.
33. Gisch, N., et al., *The pneumococcal cell wall*, in *Streptococcus pneumoniae: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions*, J.S. Brown, S. Hammerschmidt, and C.J. Orihuela, Editors. 2015, Elsevier: UK.
34. Gisch, N., et al., *Structural Reevaluation of Streptococcus pneumoniae Lipoteichoic Acid and New Insights into Its Immunostimulatory Potency*. J Biol Chem, 2013. **288**(22): p. 15654-67.
35. Goebel, W.F. and M.H. Adams, *The immunological properties of the heterophile antigen and somatic polysaccharide of Pneumococcus*. J Exp Med, 1943. **77**(5): p. 435-49.
36. Goebel, W.F., et al., *The heterophil antigen of Pneumococcus*. J Biol Chem, 1943. **148**: p. 1-15.
37. Behr, T., et al., *The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies*. Eur J Biochem, 1992. **207**(3): p. 1063-75.
38. Fischer, W., et al., *Teichoic acid and lipoteichoic acid of Streptococcus pneumoniae possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide)*. Eur J Biochem, 1993. **215**(3): p. 851-7.
39. Denapaite, D., et al., *Biosynthesis of Teichoic Acids in Streptococcus pneumoniae and Closely Related Species: Lessons from Genomes*. Microb Drug Resist, 2012. **18**(3): p. 344-58.
40. Coyne, M.J., et al., *Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of Bacteroides fragilis*. Infection and Immunity, 2001. **69**(7): p. 4342-50.
41. Baur, S., et al., *Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2009. **191**(4): p. 1200-10.
42. Fan, X., et al., *Multiple mechanisms for choline transport and utilization in Haemophilus influenzae*. Mol Microbiol, 2003. **50**(2): p. 537-48.
43. Whiting, G.C. and S.H. Gillespie, *Incorporation of choline into Streptococcus pneumoniae cell wall antigens: evidence for choline kinase activity*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **138**(2-3): p. 141-5.

44. Whiting, G.C. and S.H. Gillespie, *Investigation of a choline phosphate synthesis pathway in Streptococcus pneumoniae: evidence for choline phosphate cytidylyltransferase activity*. FEMS Microbiology Letters, 1996. **143**(2-3): p. 279-84.
45. Rock, C.O., et al., *The licC gene of Streptococcus pneumoniae encodes a CTP:phosphocholine cytidylyltransferase*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(16): p. 4927-31.
46. Zhang, J.R., et al., *Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism*. Mol Microbiol, 1999. **31**(5): p. 1477-88.
47. Damjanovic, M., et al., *The Essential tacF Gene Is Responsible for the Choline-Dependent Growth Phenotype of Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2007. **189**(19): p. 7105-11.
48. Alaimo, C., et al., *Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 967-76.
49. Rick, P.D., et al., *Evidence that the wzxE gene of Escherichia coli K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16534-42.
50. Eberhardt, A., et al., *Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist, 2012. **18**(3): p. 240-55.
51. Kawai, Y., et al., *A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins*. Embo j, 2011. **30**(24): p. 4931-41.
52. Chan, Y.G., et al., *Staphylococcus aureus mutants lacking the LytR-CpsA-Psr family of enzymes release cell wall teichoic acids into the extracellular medium*. J Bacteriol, 2013. **195**(20): p. 4650-9.
53. Ruan, X., et al., *The WaaL O-antigen lipopolysaccharide ligase has features in common with metal ion-independent inverting glycosyltransferases*. Glycobiology, 2012. **22**(2): p. 288-99.
54. Wu, K., et al., *A novel protein, RafX, is important for common cell wall polysaccharide biosynthesis in Streptococcus pneumoniae: implications for bacterial virulence*. J Bacteriol, 2014. **196**(18): p. 3324-34.
55. Gisch, N., et al., *Lipoteichoic acid of Streptococcus oralis Uo5: a novel biochemical structure comprising an unusual phosphorylcholine substitution pattern compared to Streptococcus pneumoniae*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16718.
56. Severin, A., D. Horne, and A. Tomasz, *Autolysis and Cell Wall Degradation in a Choline-Independent Strain of Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist, 1997. **3**(4): p. 391-400.
57. Gutiérrez-Fernández, J., et al., *Modular Architecture and Unique Teichoic Acid Recognition Features of Choline-Binding Protein L (CbpL) Contributing to Pneumococcal Pathogenesis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38094.
58. Briles, E.B. and A. Tomasz, *Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid*. J Biol Chem, 1973. **248**(18): p. 6394-7.
59. Horne, D.S. and A. Tomasz, *Possible Role of a Choline-Containing Teichoic Acid in the Maintenance of Normal Cell Shape and Physiology in Streptococcus oralis*. J Bacteriol, 1993. **175**(6): p. 1717-22.
60. Rennemeier, C., et al., *Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3118-32.
61. Schulz, C., et al., *Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of Streptococcus pneumoniae*. MBio, 2014. **5**(6).
62. Hess, N., et al., *Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of Streptococcus pneumoniae*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 2093.
63. Sanderson, A.R., J.L. Strominger, and S.G. Nathenson, *Chemical structure of teichoic acid from Staphylococcus aureus, strain Copenhagen*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 3603-13.
64. Fischer, W., *Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol, 1994. **183**(2): p. 61-76.
65. Santa Maria, J.P., Jr., et al., *Compound-gene interaction mapping reveals distinct roles for Staphylococcus aureus teichoic acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(34): p. 12510-5.

66. Cundell, D.R., et al., *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 1995. **377**(6548): p. 435-8.
67. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
68. Galán-Bartual, S., et al., *Structure and Function of Choline-Binding Proteins*, in *Streptococcus pneumoniae: molecular mechanisms of host-pathogen interaction*, J.S. Brown, S. Hammerschmidt, and C.J. Orihuola, Editors. 2015, Elsevier: UK.
69. Vollmer, W. and A. Tomasz, *Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2001. **39**(6): p. 1610-22.
70. Høltje, J.V. and A. Tomasz, *Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus*. *J Biol Chem*, 1974. **249**(21): p. 7032-4.
71. Draing, C., et al., *Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(45): p. 33849-59.
72. Yother, J., et al., *Generation and Properties of a Streptococcus pneumoniae Mutant Which Does Not Require Choline or Analogs for Growth*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(8): p. 2093-101.
73. Fischer, W., *Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid*. *Microb Drug Resist*, 1997. **3**(4): p. 309-25.
74. Jennings, H.J., C. Lugowski, and N.M. Young, *Structure of the complex polysaccharide C-substance from Streptococcus pneumoniae type 1*. *Biochemistry*, 1980. **19**(20): p. 4712-9.
75. Karlsson, C., P.-E. Jansson, and U.B. Skov Sørensen, *The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms. Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine*. *Eur J Biochem*, 1999. **265**(3): p. 1091-7.
76. Tomasz, A., *Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus*. *Science*, 1967. **157**(3789): p. 694-7.
77. Kharat, A.S., et al., *Different pathways of choline metabolism in two choline-independent strains of Streptococcus pneumoniae and their impact on virulence*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(17): p. 5907-14.
78. [http://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_genomemap?ORG=sor&CHR=c&START\\_POS=600000](http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_genomemap?ORG=sor&CHR=c&START_POS=600000).
79. Zähringer, U., et al., *NMR-based structural analysis of the complete rough-type lipopolysaccharide isolated from Capnocytophaga canimorsus*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(34): p. 23963-76.
80. Ranf, S., et al., *A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in Arabidopsis thaliana*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(4): p. 426-433.
81. Grozdanov, L., et al., *A Single Nucleotide Exchange in the wzy Gene Is Responsible for the Semirough O6 Lipopolysaccharide Phenotype and Serum Sensitivity of Escherichia coli Strain Nissle 1917*. *Journal of Bacteriology*, 2002. **184**(21): p. 5912-25.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Doktorarbeit in der FG Bioanalytische Chemie unter der Erst-Betreuung von Dr. Nicolas Gisch eigenständig angefertigt, die inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen. Diese Arbeit wurde noch nie in derselben oder einer ähnlichen Fassung, auch nicht in Teilen, in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht oder veröffentlicht.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Borstel, Januar 2018

Franziska Waldow

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Bearbeitung und Anfertigung der Dissertation unterstützt und geholfen haben.

Die vorliegenden Arbeit wurden in der Bioanalytischen Chemie am Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Herrn **Dr. habil. Dominik Schwudke** als Leiter der Forschungsgruppe möchte ich dafür danken, die Arbeit in seiner Laborgruppe durchführen zu dürfen.

Ich danke in besonderem Maße **Dr. Nicolas Gisch** für das in mich gesetzte Vertrauen, die mir eingeräumte wissenschaftliche Freiraum, das interessante Thema, die vielen hilf- und lehrreichen Gespräche.

**Prof. Dr. Ulrich Schaible** möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens und **Prof. Dr. Lars Redecke** für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Meinem Zweitbetreuer **Dr. Norbert Reiling** danke ich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und das positive Feedback, dass ich jedes Mal zurückbekommen habe.

Bei unseren Kooperationspartnern aus der Uni Greifswald **Prof. Dr. Sven Hammerschmidt**, **Dr. Thomas Kohler** und **Nathalie Heß** möchte ich für konstruktive Gespräche, die schnelle Antworten auf Fragen meinerseits danken und für die freundliche Aufnahme in die Laborgruppe während meines Aufenthalts in Greifswald. Vielen Dank!

Für exzellente technische Unterstützung möchte ich im Folgenden Birte Buske, H. K., Brigitte Kunz, Ursula Schombel und Simone Thomsen danken.

Dabei möchte ich bei **Birte Buske** danken, für die Einführung in die Welt der GC/MS und die damit einhergehenden Probenvorbereitungen. Vielen Dank für kleine Kaffeepausen zwischendurch, in denen wir aufkommende Stolpersteine und Probleme beseitigen konnten.

Bei **Ursula Schombel** möchte ich mich besonders bedanken, für die große Hilfe bei den verschiedensten HPLC-Anlagen. Jedes noch so aufkommende Problem an einer der HPLC-Anlagen, konnte durch deine magischen Hände beseitigt werden! Vielen lieben Dank das du nie müde geworden bist, meine unzähligen aufkommenden Fragen zu beantworten.

Einen besonderen Dank gilt aber **Simone Thomsen**, für die Einführung in die Welt der Teichonsäure-Aufarbeitung, für diverse kleine Lacher im Labor, für Aufmunterungen, wenn ich mich der Mut verließ, für graue Wolken die du zwischendurch beiseitegeschoben hast und für kleine Überraschungen zwischendurch an meinem Arbeitsplatz!

Bei der gesamten Arbeitsgruppe „Bioanalytische Chemie“ möchte ich mich für die unglaubliche Hilfsbereitschaft, die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Ich möchte mich besonders bei drei Gastwissenschaftlern bedanken, die ich in ihrer Zeit in Borstel ins Herz geschlossen habe und nun zu einer festen Größe in meinem Leben geworden sind: **Dr. Eva Bönisch** und **Dr. Conny Rath**. Ich bin sehr dankbar, dass eure Wege euch nach Borstel geführt haben.

Bei meinen „Borsteler-Mädels“ **Anna, Steffi** und **Mahin** möchte ich mich für unzählige Mädelsabende während dieser Zeit bedanken sowie für die vielen Aufmunterungen und Lacher! Dieser Dank gilt auch meinen Freunden **Lydia, Sven, Uli** und **Elisa**.

**Sebastian**, ich danke dir dafür dass du mich bei so manchen tief aufgefangen hast und mir Mut gegeben hast - Du warst mir eine unglaubliche Stütze!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen **Eltern**, Wolfgang und Christina Waldow, bedanken für ihre langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen. Für die vielen roten Punkte beim Lernen, die mich angespornt haben weiter zu lernen auch wenn der Mut nicht da war sowie das viele Abfragen von Lernstoff. Ohne eure Unterstützung und Bemühungen stünde ich heute nicht dort wo ich bin!

## Curriculum Vitae

## Publikationsverzeichnis

- 1 Marta Palusinska-Szys, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Emilia Reszczynska, Rafal Luchowski, Magdalena Kania, Nicolas Gisch, **Franziska Waldow**, Pawel Mak, Wilold Danikiewicz, Wieslaw, I. Gruszecki, Malgorzata Cytrynska; „The Lipid composition of *Legionella dumoffii* membrane modulates the interaction with *Galleria mellonella* apolipoprotein III.“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular & Cell Biology of Lipid*, Volume 1861 (7), 2016, pp. 617-629
- 2 Nathalie Heß\*, **Franziska Waldow\***, Thomas P. Kohler\*, Manfred Rohde, Bernd Kreikemeyer, Alejandro Gómez-Mejia, Torsten Hain, Dominik Schwudke, Waldemar Vollmer, Sven Hammerschmidt<sup>§</sup>, Nicolas Gisch<sup>§</sup>; „LTA deficiency permits normal growth but impairs virulence of *Streptococcus pneumoniae*.“, \*,<sup>§</sup>equal contribution, *Nature Communication*, Volume 8, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01720-z
- 3 **Franziska Waldow**, Thomas P. Kohler, Nathalie Heß, Dominik Schwudke, Sven Hammerschmidt, Nicolas Gisch; „Attachment of phosphorylcholine residues to pneumococcal teichoic acids and modification of substitution patterns by the phosphorylcholine reesterase.“, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 293, 2018, doi: 10.1074/jbc.RA118.003360

Inhalte dieser Arbeit wurden zudem auf folgenden internationalen Tagungen vorgestellt:

- 1 **“Assessment of the specific role of the phosphorylcholineesterase (Pce) in the modification of pneumococcal teichoic acids”** (Poster)  
Franziska Waldow, Thomas P. Kohler, Dominik Schwudke, Sven Hammerschmidt, Nicolas Gisch  
2<sup>nd</sup> German Pneumococcal & Streptococcal Symposium, Rostock
- 2 **“Assessment of the specific role of the phosphorylcholineesterase (Pce) in the modification of pneumococcal teichoic acids”** (Poster)  
Franziska Waldow, Thomas P. Kohler, Dominik Schwudke, Sven Hammerschmidt, Nicolas Gisch  
12<sup>th</sup> European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus, Oxford
- 3 **„Attachment and modification of phosphorylcholine residues in teichoic acids of *Streptococcus pneumoniae*“** (Poster)  
Franziska Waldow, Nathalie Heß, Thomas P. Kohler, Dominik Schwudke, Sven Hammerschmidt, Nicolas Gisch  
3<sup>rd</sup> German Pneumococcal & Streptococcal Symposium, Braunschweig
- 4 **„Attachment and modification of phosphorylcholine residues in teichoic acids of *Streptococcus pneumoniae*“** (Poster)  
Franziska Waldow, Nathalie Heß, Thomas P. Kohler, Dominik Schwudke, Sven Hammerschmidt, Nicolas Gisch  
2<sup>nd</sup> Lipidomics Forum, Dortmund

- 5 **“Identification of the Teichoic Acid Ligase in *Streptococcus pneumoniae*”** (Vortrag)  
Franziska Waldow, Nathalie Heß, Thomas P. Kohler, Manfred Rohde, Bernd Kreikemeyer,  
Alejandro Gómez-Mejía, Torsten Hain, Dominik Schwudke, Waldemar Vollmer, Sven  
Hammerschmidt, Nicolas Gisch  
13<sup>th</sup> European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus, Stockholm