

**Suche nach Superantigen kodierenden  
Genen bei humanpathogenen  
Streptokokken der serologischen Gruppen  
C und G**

*Dissertation*

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae  
dentariae  
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Peter Seidel  
geboren am 24.03.1971 in Arnstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Straube, Jena
2. Prof. Dr. Bräuer, Jena
3. Prof. Dr. Dr. Podbielski, Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.05.2004

---

## Abkürzungsverzeichnis

AGN	akute Glomerulonephritis
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immundefizit-Syndrom)
APC	antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
ARF	akutes rheumatisches Fieber
Bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalovirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
ET	Exfoliatives Toxin
GAS, GBS, GCS, GGS	Gruppe A-, B-, C- bzw. G-Streptokokken
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isoproyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
LTT	Lymphozytentransformationstest
MAM	<i>Mycoplasma Arthridis</i> Mitogen
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
OF	Opazitätsfaktor
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
POD	Peroxydase
SAG	Superantigen
SDS	Sodiumdedecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodiumdedecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE (A-I)	staphylococcal pyrogenic enterotoxin (A-I) (pyrogenes Staphylokokken-Enterotoxin)
SMEZ	streptococcal mitogenic exotoxin Z (mitogenes Streptokokken-Exotoxin Z)

SPE (A-M)	streptococcal pyrogenic exotoxin (A-M) (pyrogene Streptokokken-Exotoxine = Superantigene)
<i>spea, spec, speg, spez/smez</i>	Gene der entsprechenden Superantigene
<i>speA, speC, speG, speZ/smeZ</i>	einzelsträngige Gensonde zur Suche nach dem entsprechenden Superantigen
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	<i>speg</i> -Gen bei Gruppe-A-Streptokokken (GAS)
<i>speg<sup>dys</sup></i>	<i>speg</i> -Gen bei humanpathogenen C- und G-Streptokokken ( <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> )
SSA	Streptokokken-Superantigen
STSS	Streptokokken bedingtes Toxisch-Schock-Syndrom
TCR	t-cell-receptor (T-Zell-Rezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TSST	Toxisch-Schock-Syndrom Toxin
YPM	<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i> Mitogen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Klassifizierung und Typisierung der Streptokokken	8
2.2 Pathologische Bedeutung der Streptokokken	10
2.3 Pathogenitätsfaktoren von Streptokokken am Beispiel der GAS	12
2.3.1 Oberflächenkomponenten	13
2.3.2 Sekretorische Proteine	13
2.4 Funktion und Wirkung von Superantigenen	15
<b>3. Zielstellung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
4.1 Bakterienstämme	22
4.2 Kultivierung und Stammhaltung	23
4.3 Isolierung chromosomaler Streptokokken-DNA	23
4.4 Herstellung der DNA-Dot-Blots	23
4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
4.6 Herstellung der Gen-Sonden	25
4.7 DNA-Hybridisierung	26
4.8 Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>	27
4.9 DNA-Sequenzanalyse	28
4.10 Klonierung in Expressionsvektoren	29
4.11 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
4.12 Proteinnachweis im Western Blot	30
4.13 Lymphozytentransformationstest (LTT)	31
4.14 Verwendete Software	31
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
5.1 Hybridisierung von GCS und GGS mit Superantigen kodierenden Sonden	33
5.1.1 Reaktion mit der Sonde <i>speA</i>	34
5.1.2 Reaktion mit der <i>speC</i>	35
5.1.3 Reaktion mit der Sonde <i>speZ/smeZ</i>	35
5.1.4 Reaktion mit der Sonde <i>speG</i>	36
5.1.5 Zusammenfassung der Hybridisierungsreaktionen	38
5.2 Sequenzanalyse des Gens <i>speG</i> aus dem GGS-Stamm 39072	39
5.2.1 Amplifizierung durch PCR	39
5.2.2 Zwischenklonierung	40
5.2.3 Sequenzierung	41
5.3 Untersuchungen zur Expression von SPEG <sup>dys</sup>	44
5.3.1 Expression in GGS-Bakterien	44
5.3.2 Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	45
<b>6. Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>51</b>

<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>Anhang</b>	<b>62</b>
Publikationen mit Ergebnissen dieser Arbeit	61
Danksagung	63
Lebenslauf	64
Ehrenwörtliche Erklärung	65

## 1. Zusammenfassung

Humanpathogene Streptokokken der serologischen Gruppen C und G (GCS/GGS) sind für 5 - 8 % aller Streptokokkeninfektionen des Menschen verantwortlich. Sie können wie die Gruppe-A-Streptokokken (GAS) eine Vielzahl eitriger Erkrankungen des oberen Respirationstraktes und der Haut hervorrufen, die zum Teil in schwere Verlaufsformen und Komplikationen wie das Streptokokken bedingte Toxisch-Schock-Syndrom (STSS) münden.

Während die Virulenzfaktoren der GAS in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden, ist das Wissen über die pathogenen Wirkmechanismen bei GCS/GGS noch relativ gering. Superantigene (SAG) – Immuntoxine, die in geringsten Konzentrationen zu einer massiven T-Zell-Aktivierung und Zytokinausschüttung führen und damit als Hauptverantwortliche für das STSS bei GAS gelten – wurden bei C- und G-Streptokokken bisher nicht nachgewiesen.

Anliegen dieser Arbeit war es deshalb, nach Superantigen kodierenden Genen bei GCS und GGS zu suchen. Dazu wurden 7 GCS- und 17 GGS-Stämme aus der Stammsammlung der FSU Jena mit dem Verfahren der DNA-Hybridisierung überprüft. Als Vergleich und Kontrollgruppe dienten 4 GAS-Stämme, die unterschiedliche SAG-Gene tragen.

Für die Hybridisierung wurden die Gene der GAS-Superantigene SPEA, SPEC und SPEZ/SMEZ sowie SPEG durch PCR amplifiziert und als Sonden an der DNA der GCS/GGS-Stämme eingesetzt. Die Primersequenzen für die PCR wurden aus publizierten SAG-Gen-Sequenzen von A-Streptokokken konstruiert.

In den Untersuchungen konnten Gene der „klassischen“ Superantigene SPEA, SPEC und SPEZ/SMEZ in den GCS/GGS-Stämmen nicht nachgewiesen werden. Dagegen fanden wir mit der Sonde für das Gen des 1999 neu entdeckten SPEG bei vielen GCS/GGS-DNA-Proben eindeutig positive Hybridisierungsspot. Bei 2 von 7 GCS- und 13 von 17 GGS-Stämmen war eine Bindung der Sonde feststellbar. Das heißt, Abschnitte des Genoms der entsprechenden Stämme stimmen mit der *speg*-Sequenz von GAS überein bzw. sind stark ähnlich.

Aus DNA des G-Streptokokken-Stamms 39072 gelang durch PCR mit den *speg*-Primern der A-Streptokokken die Amplifizierung eines DNA-Fragments, das die gleiche Größe wie das Gen *speg* der GAS (*speg*<sup>GAS</sup>) aufweist. Durch eine anschließende Sequenzierung konnten wir zeigen, dass nicht nur die Größe des potentiellen neuen Gens der von *speg*<sup>GAS</sup> entspricht, auch die Anordnung der Nukleinsäuren stimmt in sehr hohem Maße überein. Trotzdem gibt es – vor allem im mittleren Bereich – auch signifikante Unterschiede. Auf Grund der taxonomi-

schen Einteilung der humanpathogenen GCS/GGS als *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* erhielt die neue Sequenz den Namen *speg<sup>dys</sup>* und wurde unter dieser Bezeichnung der internationalen NCBI-Gendatenbank zur Verfügung gestellt (Accessionnummer AJ294849).

In einem offenen Leserahmen kodiert *speg<sup>dys</sup>* das Protein SPEG<sup>dys</sup>. Die Aminosäureanordnung ist zu 82 Prozent gleich der beim pyrogenen Exotoxin der A-Streptokokken (SPEG<sup>GAS</sup>) und zusätzlich zu 5 Prozent ähnlich. Beide Proteine sind 234 Aminosäuren lang. Diese große Ähnlichkeit von SPEG<sup>dys</sup> und SPEG<sup>GAS</sup> lässt auf ebenfalls ähnliche Eigenschaften schließen. Das heißt, die Identifizierung von *speg<sup>dys</sup>* ist der erste Nachweis eines Superantigen kodierenden Gens bei Gruppe-C- und G-Streptokokken und damit auch der erste überhaupt bei humanpathogenen Streptokokken außerhalb der Serogruppe A.

Trotz großer Anstrengungen gelang es uns bisher nicht, das Protein SPEG<sup>dys</sup> für eine Funktionsanalyse rekombinant zu exprimieren. Das Gen wurde von den Expressionsstämmen sofort eliminiert oder es kam zu Deletionen, die zur Zerstörung des Leserahmens führten. Wahrscheinlich ist das Protein derart toxisch, dass eine Expression in *E. coli* nicht durchführbar ist. Allerdings laufen im Labor Dr. Schmidt zur Zeit neue Versuche mit völlig anderen Expressionssystemen, die erste Erfolge zeigen.

Ansonsten fanden wir auch in der Streptokokkenkultur keine Anzeichen einer Expression von SPEG<sup>dys</sup>. Lymphozytentransformationstest und andere Untersuchungen auf mögliche Mitogenität verliefen negativ. Genauso brachte die *in vitro* Infektion menschlicher Zellkulturen mit *speg<sup>dys</sup>*-tragenden Streptokokken keine Indizien, die auf eine Expression von SPEG<sup>dys</sup> hindeuten.

Trotz dieser Ergebnisse ist es möglich, dass unter bestimmten Bedingungen *in vivo* eine Expression von SPEG<sup>dys</sup> stattfindet (Roth et al., 1999). Auf Grund der großen Ähnlichkeit von SPEG<sup>dys</sup> und SPEG<sup>GAS</sup> – die Homologie ist mit 82 Prozent größer als die der am nächsten miteinander verwandten GAS-Superantigene SPEJ und SPEC (56 %) – ist es sehr wahrscheinlich, dass ein gebildetes Protein SPEG<sup>dys</sup> dann eine superantigene Wirkung entwickeln kann.

Obwohl uns bisher der biologische Nachweis einer mitogenen Aktivität der GGS- und GGS-Stämme nicht gelungen ist, offenbart die Entdeckung des Gens *speg<sup>dys</sup>*, dass an den dramatischen Komplikationen einiger GCS/GGS-Infektionen durchaus Superantigene beteiligt sein können. Mit dem potentiellen Superantigen SPEG<sup>dys</sup> wurde in dieser Arbeit ein für *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* neuer Pathogenitätsfaktor identifiziert, der – im



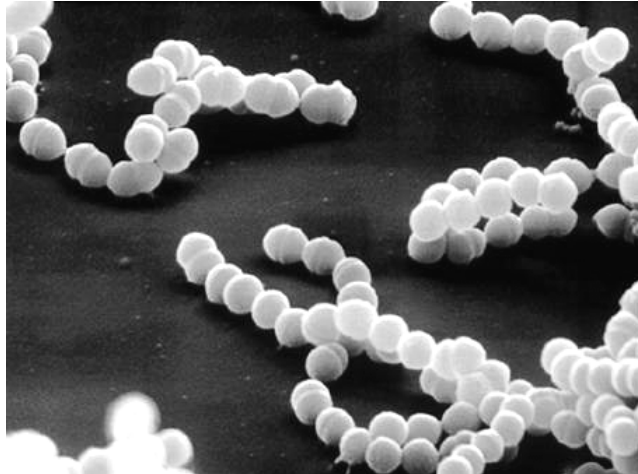
Gegensatz zu den bisher bekannten – auch die Auslösung des Streptokokken bedingten Toxisch-Schock-Syndrom durch Streptokokken der Serogruppen C und G erklärt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass C- und G-Steptokokken ähnliche Virulenzgene wie Gruppe-A-Streptokokken besitzen können und in ihrer Pathogenität nicht unterschätzt werden dürfen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Klassifizierung und Typisierung der Streptokokken

Streptokokken sind in Paaren oder Ketten angeordnete, runde bis länglich ovale gram-positive Bakterien. Sie wachsen aerob und fakultativ anaerob und stellen hohe Nährbodenansprüche.



**Abbildung 2-1**  
Streptokokken im Rasterelektronenmikroskop.  
Oliver Meckesr/Photo Researchers, Inc.

Die Gattung *Streptococcus* setzt sich aus vielen Arten zusammen. Aus praktischen Gründen wird in der klinischen Mikrobiologie allerdings eine Einteilung gebraucht, die vor allem auf dem Hämolysevermögen (Schottmüller, 1903 bzw. Brown, 1919) und der Antigenstruktur beruht (Lancefield, 1933).

Nach dem Wachstum auf Blutagar unterscheidet man drei Hämolysearten:

- $\alpha$ -Hämolyse: Grünliche schmale Höfe um die Bakterienkolonien, in denen die Erythrozytenmembranen weitgehend erhalten sind. Die Vergrünung kommt durch die Reduktion des Hämoglobins in eine biliverdinähnliche Verbindung zustande.
- $\beta$ -Hämolyse: Relativ große durchsichtige Höfe um die Kolonien, keine intakten Erythrozyten mehr, das Hämoglobin ist abgebaut.
- „ $\gamma$ -Hämolyse“: Keine sichtbare Hämolyse auf Blutagar.

Grundlage der Klassifizierung nach dem Antigencharakter ist die Feinstruktur eines in der Zellwand lokalisierten Polysaccharids, der „C-Substanz“. Diese erlaubt die Einteilung in mindestens 24 serologische Gruppen (A-Z).

Bei den klassischen Methoden der Serotypisierung werden die Zellen dazu chemisch und enzymatisch extrahiert und das spezifische Gruppenpolysaccharid durch Immunpräzipitation mit entsprechenden Antiseren nachgewiesen (Fuller, 1938; Lancefield, 1933; Rantz und Randall, 1955). Statt der Ringpräzipitation wird heute überwiegend die Agargelpräzipitation nach Ouchterlony benutzt, die den Verbrauch an Serum senkt und auch die Beurteilung von Identitätsreaktionen erlaubt. In den letzten Jahren ist eine Reihe von Schnelltests auf den Markt gekommen, die die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit A, B, C, D, F und G innerhalb von 15 Minuten ermöglicht. Mit Antikörpern beladene Latexpartikel führen bei Vorhandensein des entsprechenden Antigens zu einer Agglutination (Günther, 1996). Spezifische Nachweismethoden für die in dieser Arbeit untersuchten C- und G-Streptokokken (GCS/GGS) sind der Bacitracin-Test (Lawrence et al., 1985) und (nur GCS) die Agglutination mit dem Lektin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (Köhler et al., 1973).

Innerhalb einiger serologischer Gruppen ermöglichen bestimmte Oberflächenantigene eine weitergehende Differenzierung. Zum Beispiel lassen sich die Gruppe-A-Streptokokken (GAS) auf Grund des zellwandständigen M-Proteins in über 100 Serovare einteilen. Dies ist unter anderem deswegen wichtig, weil die Immunität des Wirtsorganismus streng typspezifisch ist.

Nur die Serogruppen A und B lassen sich uneindeutig Spezies zuordnen. *Streptococcus pyogenes* entspricht der Serogruppe A, *S. agalactiae* der Serogruppe B. Eine Einordnung der GCS/GGS bietet folgende Tabelle:

<i>Spezies</i>	<i>Wirt</i>	<i>Hämolyse</i>	<i>Lancefield-Gruppe</i>
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	Mensch	β	C, G
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	Tier	α, β, γ	C, G, L

**Tabelle 2-1**

Taxonomische Einordnung von Streptokokken der Gruppen C und G.  
(nach Vandamme et al., 1996)

Die hier untersuchten humanpathogenen GCS/GGS sind demnach als *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* zu bezeichnen. *S. milleri*, die ebenfalls die C- und G-Gruppengene besitzen können, lassen sich durch ihre Wuchsform (winzige Kolonien auf Blutagar) ausschließen.

## 2.2 Pathologische Bedeutung der Streptokokken

Unter den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken besitzen vor allem die serologischen Gruppen A, B, C, D, G, H und F humanpathogene Bedeutung.

Für die meisten Streptokokken-Erkrankungen beim Menschen (ca. 90 %) sind die Gruppe-A-Streptokokken verantwortlich. Neben einem symptomlosen Trägerstadium können sie schwere, invasive und z. T. auch tödlich verlaufende Infektionen verursachen. Man unterscheidet akute und verzögerte, nichteitrige Erkrankungen. Mit Ausnahme der stummen Infektion gesunder passagerer Keimträger können alle Infekte zur schwersten Komplikation, dem Streptokokken bedingten Toxisch-Schock-Syndrom (STSS), führen. Die folgende Übersicht zeigt eine Zusammenstellung der von GAS hervorgerufenen Krankheitsbilder (Köhler, 1995).

- I. Trägerstadium
- II. Akute Erkrankungen
  - Nichtinvasive Infektionen
    - der Schleimhaut: Tonsillitis, Pharyngitis, Otitis media, Sinusitis
    - der Haut: Hautläsionen, Impetigo
    - Scharlach
    - Puerperalsepsis
  - Invasive Infektionen
    - Wundinfektionen, Meningitis, Pneumonie, Peritonitis, septische Arthritis, Osteomyelitis, Zellulitis, nekrotisierende Fasciitis
    - bei Blutbahneinbruch: Bakteriämie, Sepsis, toxischer Schock
- III. Nachfolgeerkrankungen
  - akutes rheumatisches Fieber (ARF), akute Glomerulonephritis (AGN)

Mittel der Wahl zur Therapie ist Penicillin G oder V. Resistenzen kommen bisher nicht vor. Als Alternativen bieten sich orale Cephalosporine oder Makrolid-Antibiotika an.

Gruppe-B-Streptokokken (GBS) verursachen nur gelegentlich bei abwehrgeschwächten Individuen wie Diabetikern Wundinfektionen, Sepsis, Meningitis, Harnwegsinfektionen, Pneumonien oder Peritonitiden. Bei Neugeborenen dagegen tritt eine Sepsis, z. T. mit Meningitis, mit einer Inzidenz von ca. einer auf 1000 Geburten auf. Im Falle des „early-onset-Typs“ (erste 5 – 8 Lebensstage) beträgt die Letalität bis zu 50 %. Außerdem sind B-Streptokokken wichtige Erreger in der Veterinärmedizin. Sie rufen den „gelben Galt“, die häufigste Mastitisform der Rinder, hervor. Allerdings dürften die Erkrankungen des Menschen nur in Ausnahmefällen vom Rind oder der Milch herrühren, da es sich bei Mensch und Rind um unterschiedliche GBS-Populationen handelt. Therapeutisch wird Penicillin G kombiniert mit Gentamycin empfohlen.

Gruppe-C- und G-Streptokokken werden ebenfalls oft von Tieren isoliert. Dennoch verursachen sie, ähnlich der GAS, auch schwere eitrige Infektionen beim Menschen. Für insgesamt ca. 5 % aller humanen Streptokokken-Infektionen sind GCS/GGS verantwortlich. In der Literatur sind folgende Erkrankungen beschrieben:

	Erkrankung	Referenz
C-Streptokokken	akute Pharyngitis	Bisno et al., 1996
	Osteomyelitis	Barson, 1986
	akute Psoriasis	Henderson und Highet, 1988
	Bakteriämie	Carmeli und Ruoff, 1995
	Endokarditis	Bradley et al., 1991
	nekrotisierende Fasciitis	Gaunt et al., 1984
	Zellulitis	Portnoy und Reitler, 1994
	Epiglottitis	Schwartz et al., 1982
	Meningitis	Mohr et al., 1979
	STSS	Keiser und Campbell, 1992
G-Streptokokken	akute Pharyngitis	Stryker et al., 1982
	akute Psoriasis	Henderson und Highet, 1988
	Meningitis	Sepkowitz et al., 1992
	akute Glomerulonephritis	Gnann et al., 1987
	Myositis	Wagner et al., 1996
	Endokarditis	Venezio et al., 1986
	Zellulitis	Gaunt und Seal, 1986
	Sepsis	Schnitzler et al., 1995
	reaktive Arthritis	Young et al., 1992
	STSS	Roth et al., 1999

**Tabelle 2-2**

Von GCS/GGS verursachte Erkrankungen mit entsprechenden Literaturreferenzen.

Die Therapie erfolgt nach den gleichen Regeln wie bei Infektionen mit GAS.

Als klassische Opportunisten besitzen die Enterokokken (D-Gruppenantigen) ein geringeres pathogenes Potential. Trotzdem können auch sie Harnwegsinfekte oder Endokarditis hervorrufen. Als einzige Streptokokkenspezies zeigen die Enterokokken eine ausgeprägte Neigung zur Antibiotikaresistenz. Therapeutisch ist ein Aminopenicillin mit Streptomycin oder Gentamycin zu kombinieren und auf eine bakterizide Wirkung zu achten.

Für 50 - 70 % aller bakteriellen Endokarditiden sind die oft auch Viridans-Gruppe bezeichneten oralen Streptokokken verantwortlich. Diese vergrünenden und nicht-hämolisierenden Streptokokken können durch Läsionen in der Mundschleimhaut in das Gefäßsystem einbrechen und nach einer transitorischen Bakteriämie die Herzklappen besiedeln. Typisch ist die Ausbildung einer chronischen, langsam verlaufenden Endokarditis (*Endocarditis lenta*). Zur Therapie wird Penicillin G allein oder kombiniert mit einem Aminoglykosid für 4 Wochen empfohlen. Ebenfalls zu den oralen Streptokokken zählen die für die Kariogenese wichtigen *S. mutans*, *S. sanguis* und *S. mitis*.

### **2.3 Pathogenitätsfaktoren von Streptokokken am Beispiel der GAS**

In ihrer besonderen Virulenz vereinigen die A-Streptokokken eine große Zahl wichtiger bei Streptokokken vorkommender Pathogenitätsfaktoren. Bei GAS sind die pathogenen Wirkmechanismen am besten untersucht.

Unter Pathogenität versteht man die Fähigkeit bestimmter Mikroorganismen, pathologische Zustände und Krankheiten auszulösen. Maß dieser Eigenschaft ist die Virulenz. Voraussetzung für Pathogenität sind, neben der Adhäsion an der (Schleim-) Haut, dem Durchbrechen der Gewebsbarriere und dem Eindringen in tiefere Schichten, das Wachstum und die Vermehrung im Wirt durch das Negieren oder Eliminieren der Immunabwehr (Smith, 1995).

Grundsätzlich kann man die Pathogenitätsfaktoren in Oberflächenkomponenten und extrazelluläre Produkte einteilen.

### **Oberflächenkomponenten**

Das Grundgerüst der Streptokokkenzellwände besteht aus Peptidoglykan, das mit dem gruppenspezifischen Polysaccharid einen stabilen Komplex bildet. Dieser ist vom Wirt nur schwer enzymatisch abbaubar und besitzt eine Gewebetoxizität, die selbst von abgestorbenen Zellen noch ausgeht. Viele gram-positive Streptokokken enthalten außerdem Lipoteichonsäuren, die durch die Bindung an Fibronectin eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen spielen. Ebenfalls fibronectin-bindend wirken der Serumopazitätsfaktor OF (Rakonjac et al., 1995) und das Protein F (Hasty et al., 1992).

Zu den wichtigsten auf der Zelloberfläche exprimierten Virulenzfaktoren zählen auf Grund ihrer antiphagozytären Eigenschaften die M-Proteine. Durch Kopplung an M-Protein bindende Plasmaproteine des Wirtes kann dieser die Streptokokken nicht mehr als Parasiten erkennen. Weitere pathogene Bedeutung haben die M-Proteine der Serogruppe A durch die Kreuzreaktion mit menschlichen Gewebeantigenen. Durch gleichartige Strukturen oder auch identische Aminosäure-Sequenzepitope verschiedener Humanproteine (z. B. Myosin [Dale und Beachey, 1985], Keratin [Geyer et al., 1999]) können M-Proteine die Bildung kreuzreaktiver Antikörper induzieren.

Ebenfalls ein wichtiger Virulenzfaktor der Zellwand ist die C5a-Peptidase, die vom Komplementfaktor C5a ein Hexapeptid abspaltet und somit die chemotaktische Aktivierung der Granulozyten verhindert (Chen und Cleary, 1990).

Streptokokken sind in der Lage, Hyaluronkapseln zu bilden, die auf Grund ihrer Identität mit der Hyaluronsäure im humanen Bindegewebe keine Antikörperbildung induzieren und nach neuen Untersuchungen im Hühnerembryonenmodell (Schmidt et al., 1996) oder im Blut (Dale et al., 1996) pathogen wirken. In den 80er Jahren bildeten in den USA viele Isolate von Patienten mit rheumatischem Fieber oder STSS Hyaluronsäurekapseln (Köhler, 1995).

### **Sekretorische Proteine**

Die vielfältigen extrazellulär ausgeschiedenen Produkte stellen Antigene dar, besitzen teilweise aber auch enzymatischen Charakter.

So vermag die Streptokinase (Huang et al., 1989) fibrinhaltige Gerinnsel aufzulösen, indem sie an Plasminogen bindet und dieses aktiviert. Deshalb wird die aus einem Gruppe-C-Stamm

gewonnene Streptokinase zur Therapie von Thrombosen eingesetzt.

Der Pathogenitätsfaktor Hyaluronidase spaltet Hyaluronsäure als Bestandteil vieler Membranen und ist somit für Gewebeerstörung und Invasivität mitverantwortlich.

Extrazelluläre Streptokokken-DNasen, für die bisher vier verschiedenen Typen (A-D) nachgewiesen wurden, gelten wegen ihrer gegen DNA und RNA gerichteten Aktivität als Virulenzfaktoren. Es wird durch sie eine Erhöhung der Invasivität der Streptokokken vermutet (Podbielski et al., 1996).

Das sauerstofflabile Streptolysin O ist ein bakterielles Hämolysin. Es wirkt zerstörend auf cholesterolhaltige Zellmembrane, indem es hydrophile Kanäle erzeugt (Bhakdi et al., 1985). Ebenfalls membrantoxisch, allerdings als einziges extrazelluläres Streptokokkenprodukt nicht antigen, wirkt Streptolysin S.

Stark immunogenen Charakter hat die von GAS produzierte extrazelluläre Proteinase (Todd, 1947). Das papainähnliche Enzym wird als Zymogen sezerniert und kann durch reduzierende Substanzen und proteolytische Enzyme in die aktive Proteinase umgewandelt werden (Tai et al., 1976). Gerlach et al. (1983) wiesen nach, dass die Vorstufe der Proteinase mit dem erythrogeneren Toxin B identisch ist. Die Proteinase B kann vermutlich schwere Gewebszerstörungen auslösen, ist aber nach mehreren Untersuchungen (Gerlach et al., 1994; Fleischer, 1995) kein Superantigen.

Weiterhin produzieren *S. pyogenes* Stämme Immuntoxine, die als erythrogene Toxine (streptococcal pyrogenic exotoxins – SPEs) bezeichnet werden und als Superantigene wirken können (siehe 2.4 und Tabelle 2-4).

Trotz ähnlicher Krankheitsbilder (siehe 2.2) ist über die pathogenen Wirkmechanismen bei C- und G-Streptokokken relativ wenig bekannt. Nachgewiesen wurden bisher die Streptokinase (Malke et al., 1985), die C5a-Peptidase (Cleary et al., 1991) und das M-Protein (Geyer et al., 1999).

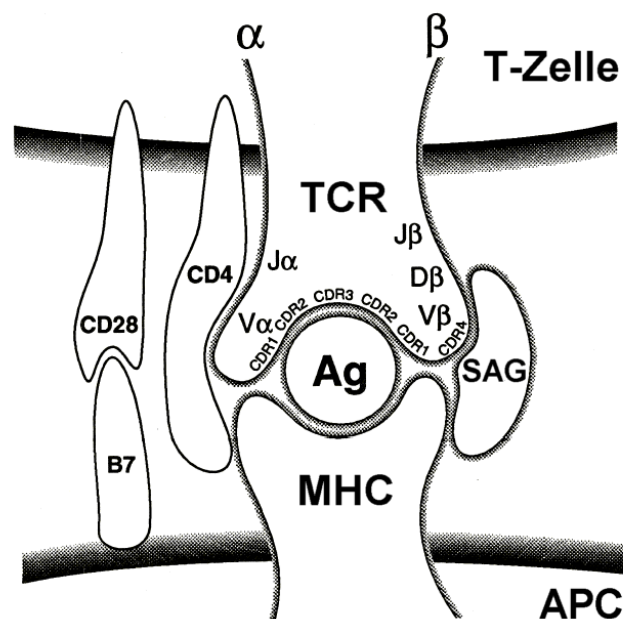
Diese Arbeit soll klären, ob auch GCS/GGS genetische Informationen von Superantigenen besitzen und sie in der Lage sind, solche Toxin zu produzieren.



## 2.4 Funktion und Wirkung von Superantigenen

Superantigene (SAGs) sind mikrobielle Toxine, die auf das Immunsystem wirken. Sie führen zu massiver T-Zell-Aktivierung und Zytokinausschüttung. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen wie toxischer Schock, Lebensmittelvergiftung und Autoimmunerkrankungen (Fleischer 1996).

Superantigene verknüpfen wie andere Antigene den T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zellen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (Major Histocompatibility Complex – MHC) von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und lösen so die Stimulation des Immunsystems aus (Fraser et al., 2000; McCormick et al, 2001). Im Gegensatz zu konventionellen Antigenen bedürfen sie allerdings keiner Prozessierung und binden nicht in der Peptidbindungstasche des T-Zell-Rezeptors, sondern an einer weniger variablen Region, der V $\beta$ -Domäne (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2**

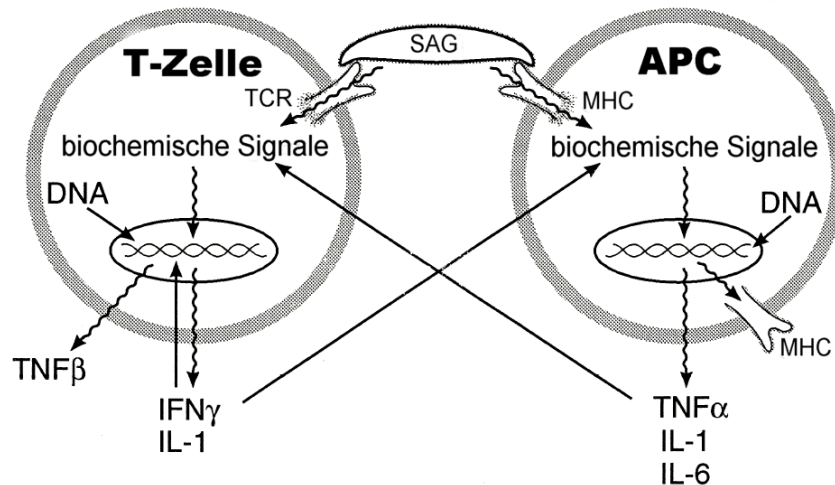
Unterschiedliche Verknüpfung von T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle und MHC II der antigenpräsentierenden Zelle (APC) durch Antigen (Ag) und Superantigen (SAG). (nach Kotb, 1995)

Beim Menschen unterscheidet man auf Grund der Sequenz 25 V $\beta$ -Konfigurationen. Jedes Superantigen bindet nur an ein spezifisches Spektrum dieser V $\beta$ -Varianten (siehe Tabelle 2-4).

Entsprechend der Häufigkeit der Expression dieser V $\beta$ -Typen kann ein Superantigen 2 - 20 % aller T<sub>H</sub>-Zellen aktivieren. Verglichen mit normalen antigenen Peptiden, die nur eine von 10.000 bis 1.000.000 Zellen anregen, ist das eine enorme Steigerung. Diese deutlich verstärkte Aktivierung von T-Lymphozyten führt natürlich ebenso zu einer drastischen Erhöhung der Menge der ausgeschütteten Interleukine und Interferone. Letztlich sind Superantigene bereits in einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> M – das bedeutet wenige Picogramm pro Milliliter – aktiv.

Dazu trägt bei, dass es zwischen von T-Zellen und APC sezernierten Zytokinen zu Synergien kommt (Abbildung 2-3). So steigert IFN- $\gamma$  die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (Ting und Baldwin, 1993), was eine Erhöhung der Anzahl der Rezeptoren für Superantigene bedeutet und letztlich die Produktion von Immunmediatoren weiter fördert.

Insgesamt verursachen die freigesetzten Stoffe eine nicht adäquate extreme, z. T. schockartige Aktivierung und Stimulierung des Immunsystems. Die Wirkungen der einzelnen Verbindungen sind in Tabelle 2-3 dargestellt.



**Abbildung 2-3**

Interaktion der von T-Zellen und APC ausgeschütteten Zytokine.  
 IL – Interleukin, IFN – Interferon, TNF – Tumornekrosefaktor  
 (nach Kotb, 1995)

Ausprägung finden die molekularen Reaktionen in verschiedenen Krankheitsbildern. Gesichert ist die Beteiligung von Staphylokokken Pyrogenen Enterotoxinen (SEs) an bestimmten Arten der Lebensmittelvergiftung (Balaban und Rasooly, 2000). Sowohl SEs als auch SPEs können ein “toxin-shock-syndrom“ hervorrufen (StaphTSS/StrepTSS oder nur

STSS) (Norrby-Teglund et al., 2001). Vor allem das StrepTSS ist häufig mit disseminierten Infektionen, schweren Schmerzen, Gewebeanvasion und Bakteriämie verbunden (Stevens, 1992). Gefährlichste Komplikationen sind Schock, nekrotisierende Fasciitis und Multi-Organ-Versagen. Trotz Antibiotikaeinsatzes und intensivmedizinischer Intervention beträgt die Letalität bis zu 30 % (Working Group on Severe Streptococcal Infections, 1993).

Neben anderen Theorien sind Superantigene auch als Ursache für den plötzlichen Kindstod im Gespräch (Blackwell et al., 1993). Ebenso werden sie mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie rheumatischen Herzbeschwerden (Watanabe-Ohnishi et al., 1994), rheumatoider Arthritis (Paliard et al., 1991), Multipler Sklerose (Wucherpfennig et al., 1992), Sjögren Syndrom (Sumida et al., 1992) und der Kawasaki Krankheit (Yarwood et al., 2000) in Zusammenhang gebracht. Selbst bei AIDS könnten Superantigene eine Rolle spielen (Weber und Cantor, 1993; Muller und Kohler, 1997).

Zytokin	Induzierte Aktivität/Wirkung
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphokinfreisetzung aus aktivierten T-Zellen</li> <li>- Proliferation oder Differenzierung von B-Zellen</li> <li>- Chemotaxis von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten</li> <li>- Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub>, Kollagenase und Akute-Phase-Proteinen</li> <li>- natürliche Killer-Zell-Aktivität</li> <li>- Wachstum von Fibroblasten, Synovialzellen und Endothelzellen</li> <li>- Gewebeabbau</li> <li>- Induktion von Fieber</li> </ul>
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- B-Zell-Differenzierung/Stimulierung</li> <li>- Proliferation von Thymozyten</li> <li>- Produktion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten</li> <li>- erhöhte Klasse-I-MHC-Expression auf Fibroblasten</li> <li>- Wachstum von Plasmazytomen und Hybridomen</li> </ul>
IFN- $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induktion der Monozytendifferenzierung</li> <li>- erhöhte natürliche Killer-Zell-Aktivität</li> <li>- erhöhte antimikrobielle und tumorizide Aktivität</li> <li>- verstärkte Tumor-Nekrose-Faktor- und Lymphotoxin-Aktivität</li> <li>- verminderte Virusreplikation in Zellen</li> <li>- vermindertes Zellwachstum</li> <li>- erhöhte Expression von Klasse-II-Molekülen und Immunglobulin-Fc-Rezeptoren auf Makrophagen</li> <li>- Stimulation der IL-1- und IL-2-Synthese</li> <li>- Stimulation der Immunglobulinproduktion in unseparierten mononucleären Zellen</li> </ul>

TNF- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulation der Produktion von IL-1, IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\beta</math></li> <li>- Veränderung von Wachstum und Morphologie von Epithelzellen</li> <li>- Verstärkung der Adhäsionskraft der Endothelzellen für Entzündungszellen</li> <li>- Förderung der Blutgerinnung durch</li> <li>- Hemmung des Thrombomodulin</li> <li>- Inhibition von Plasminogenaktivatoren</li> <li>- Förderung von Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren</li> <li>- zytotoxische und zytostatische Effekte auf Tumorzellen</li> <li>- generell Einfluss auf Entzündung, Sepsis, Lipid- und Proteinstoffwechsel, Blutbildung, Angiogenese, Wundheilung und Immunabwehr als Bestandteil des Netzwerkes der interagierenden Immun- und Entzündungssignale</li> </ul>
---------------	---

**Tabelle 2-3**

Übersicht über die Wirkungen der von T-Zellen und APC ausgeschütteten Zytokine.  
(verändert und ergänzt nach Klein, 1991)

Superantigene sind bis jetzt hauptsächlich von gram-positiven Bakterien, speziell von Staphylokokken (*S. aureus*) und Streptokokken (*S. pyogenes*), beschrieben worden. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, handelt es sich um globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa.

Staphylokokken-Superantigene sind die Staphylokokken Enterotoxine, das Toxisch-Schock-Syndrom Toxin 1 (TSST-1) (Marrack und Kappler, 1990) und das Exfoliative Toxin (ET) (Monday et al., 1999). Zu den Streptokokken-SAGs gehören die Streptokokken Pyrogenen Exotoxine (SPE), die Streptokokken Mitogenen Exotoxine (SMEZ) (Proft et al., 1999) und das Streptokokken Superantigen (SSA) (Reda et al., 1994). Die Aminosäuresequenzen zwischen beiden Gruppen stimmen zu 20 bis 90 Prozent überein. Das lässt auf einen gemeinsamen Ursprung schließen.

Völlig unähnlich dagegen sind das *Mycoplasma Arthridis* Mitogen (MAM) (Cole und Atkin, 1991) und das *Yersinia Pseudotuberculosis* Mitogen (YPM) (Ito et al., 1995). Virale Superantigene sind nur vom Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) bestätigt (Acha-Orbea und MacDonald, 1995) und werden vom Cytomegalovirus (CMV) (Dobrescu et al., 1995), und Epstein-Barr Virus (EBV) (Sutkowski et al., 1996) vermutet.

Einen Überblick über die bisher bekannten Superantigene bietet Tabelle 2-4.

	Superantigen	Vβ-Spezifität
Staphylokokken ( <i>S. aureus</i> )	SEA	1.1, 5.3, 6.3, 6.4, 6.9, 7.3, 9.1, 23.1
	SEB	1.1, 3.2, 6.4, 15.1
	SEC1	3.2, 6.4, 6.9, 15.1
	SEC2	12, 13, 14, 15, 17, 20
	SEC3	5.1
	SED	1.1, 5.3, 6.9, 7.4, 8.1, 12.1
	SEE	5.1, 6.3, 6.4, 6.9, 8.1
	SEG	?
	SEH	?
	SEI	?
	TSST	2.1, 8.1
	ET	3, 12, 13.2, 14, 15, 17
Streptokokken ( <i>S. pyogenes</i> )	SPEA	2.1, 12.2, 14.1, 15.1
	SPEC	2.1, 3.2, 12.5, 15.1
	SPEG	2.1, 4.1, 6.9, 9.1, 12.3
	SPEH	2.1, 7.3, 9.1, 23.1
	SPEI	18.1
	SPEJ	2.1
	SMEZ	2.1, 4.1, 7.3, 8.1
	SMEZ-2	4.1, 8.1
	SSA	1, 3, 15
	SPEL	?
	SPEM	?
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	YPM	3, 9, 13.1, 13.2
Cytomegalovirus	CMV	12
Epstein-Barr Virus	EBV	13

**Tabelle 2-4**

Bisher bekannte Superantigene mit ihrem Vβ-Profil.

nach Fraser et al., 2000; Ergänzungen nach Monday et al., 1999; Ferretti et al., 2001; Smoot et al., 2002

### 3. Zielstellung der Arbeit

Wie Streptokokken der serologischen Gruppe A sind auch  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppen C und G an zahlreichen Erkrankungen des Menschen (siehe Tabelle 2-2) beteiligt (Mohr et al., 1979; Fox et al., 1993; Bisno et al., 1996). In letzter Zeit wurden zudem zunehmend GCS/GGS von Patienten mit schweren invasiven Infektionen und toxischem Schock isoliert (Keiser und Campbell, 1992; Natoli et al., 1996; Wagner et al., 1996; Hirose et al., 1997; Roth et al., 1999). Als Auslöser dieser lebensbedrohlichen Komplikationen waren vorher eigentlich nur die A-Streptokokken bekannt.

Die bisher bekannten Pathogenitätsfaktoren der C- und G-Streptokokken wie die Streptokinase (Malke et al., 1985), die C5a-Peptidase (Cleary et al., 1991) und das M-Protein (Geyer et al., 1999) erklären die Schwere derartiger durch diese Serogruppen verursachten Erkrankungen und den z. T. foudroyanten Verlauf nur unzureichend. Sequenzhomologien zwischen den M-Proteinen von GAS und GCS/GGS (Collins et al., 1992; Smirnov et al., 1992; Ben Nasr et al., 1993; Schnitzler et al., 1995; Geyer und Schmidt, 2000) und andere GAS-ähnliche Virulenzgene lassen aber die Möglichkeit zu, dass es bei GCS/GGS eventuell weitere *S. pyogenes* analoge Pathogenitätsfaktoren gibt, z. B. einige der bei den A-Streptokokken für den toxischen Schock wahrscheinlich verantwortlichen Superantigene (Norrby-Teglund et al., 2001). Bei GAS sind zur Zeit zehn verschiedene Superantigene und alle Formen einzelner SAG bekannt (Proft et al., 1999; Ferretti et al., 2001; Smoot et al., 2002 – siehe Tabelle 2-4).

Schlievert vermutete bereits 1997 SAG-ähnliche Strukturen bei Gruppe C- und G-Streptokokken – ein Nachweis von Superantigenen oder deren kodierender Gene wurde für diese Serogruppen jedoch bisher nicht erbracht.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, im Genom von GCS/GGS-Stämmen aus der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena nach Genen von Superantigenen zu suchen, deren Sequenzen von GAS bekannt sind. Neben den drei schon lange bekannten Streptokokken SAG-Genen *spea*, *spec* und *spez/smez* wurde auch das erst 1999 von Proft et al. entdeckte *spcg* in das Screening einbezogen. Außerdem führte eine andere Mitarbeiterin der Gruppe (S. Sachse) in einer Parallelstudie Untersuchungen zu den SAG-Genen *ssa*, *speh*, *spei* und *spej* durch.

Bei positivem Befund waren die ermittelten Gene komplett zu sequenzieren und mit den entsprechenden Superantigen kodierenden Genen der A-Streptokokken zu vergleichen. Wenn möglich sollte eine Klonierung und Expression des kodierten Proteins durchgeführt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 4-1 aufgeführten 7 GCS- und 17 GGS-Stämme aus der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena benutzt.

<i>Stammnr.</i>	<i>Typ</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Material</i>
15696	G		
15704	G		
15752	G	Impetigo	
15773	G	Scharlach	Streptokokkenkultur
21969	C	Scharlach	Streptokokkenkultur
25287	C		Rachenabstrich
26322	C		Wundabstrich
39072	G	Otitis media	Ohrabstrich
39086	G	Bakteriämie, ARDS	Blutkultur
39539	G	STSS	Blutkultur
39706	G		
39821	G		
39823	C		Abstr. Hand
39841	G	Psoriasis	Abstr. R. ani
39844	G		Rachenabstrich
39845	G		Rachenabstrich
40042	G	Ekzem	Abstr. perianal
40072	C		Bronchialsekret
40093	G		Wundabstrich
40104	G	nekr.Fasciitis, STSS	
40959	C	Erysipel, STSS	Wundabstrich
42634	G		Wundabstrich
42720	G		Wundabstrich
H46A (CG1)	C		

**Tabelle 4-1**

Untersuchte G- und C-Streptokokkenstämme aus der Stammsammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

ARDS – Adulte Respiratory Distress Syndrome, STSS – Streptococcal Toxic Shock Syndrome

Als Vergleich dienten die GAS-Stämme M1 40/58, M5 Manfredo, NY5 und C203S. Auf Grund einer Arbeit von Schlievert et al. (1993), die von einer Patientin mit einem Toxisch-Schock-Syndrom, ausgelöst von einem B-Streptokokken-Stamm, berichtet, wurden nachträglich noch die zwei GBS-Stämme B3114 und B3267 in die Untersuchungen



einbezogen. Auch die Kontroll- und Vergleichsstämme entstammen der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bei molekulargenetischen Arbeiten verwendeten wir zur Klonierung die *Escherichia coli* Stämme TG1 und JM109 (Sambrook et al. 1989).

## 4.2 Kultivierung und Stammhaltung

Die Anzucht der Streptokokken aus den in 20 % Pferdeserum lyophilisierten Bakterien der Stammsammlung erfolgte auf Schafsblutagarplatten, die Kultivierung in Flüssigkultur mit Todd-Hewitt-Bouillon bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator über Nacht. Für *Escherichia coli* wurde LB-Medium benutzt, bei Klonierungen unter Zugabe des für den Selektionsdruck nötigen entsprechenden Antibiotikums.

Aufbewahrt wurden die Bakterien als Suspension unter Zugabe von 20 % (v/v) Glycerin bei -70 °C oder wieder in lyophilisierter Form.

## 4.3 Isolierung chromosomaler Streptokokken-DNA

Aus jeweils 5 ml Übernachtskultur wurden nach den Vorschriften des Genomic DNA Prep Plus Kits (A & A Biotechnology, Gdynia, Polen) die chromosomale DNA extrahiert und in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Prüfung der Präparation durch Elektrophorese in einprozentigem Agarose-Gel. Anhand der Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht ist eine Kontrolle von Quantität und Qualität der mit Ethidiumbromid eingefärbten DNA-Extrakte möglich.

## 4.4 Herstellung der DNA-Dot-Blots

Die Identifizierung bestimmter Gene oder Genfragmente auf der chromosomalen DNA ist durch Anlagerung komplementärer markierter DNA einer bekannten Sequenz möglich (Southern, 1975).

Um hybridisierbare DNA zu erhalten, ist zunächst eine Spaltung des Doppelstranges nötig. Dazu wurden jeweils 5 µg der zu untersuchenden Streptokokken-DNA (ca. 10 µl) für 10 min

mit Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) versetzt. Anschließend wurde diese Lösung durch eine Vakuum-Dot-Blot-Apparatur auf eine zuvor mit 6x SSC-Puffer äquilibrierte, ungeladene Nylonmembran übertragen. Nach Lufttrocknung erfolgte durch beidseitige UV-Bestrahlung mit 150 mJ im GS Gene Linker (BIO-RAD) eine dauerhafte Fixierung der Blots. Die gebundene Einzelstrang-DNA ist nun in der Lage, mit einem komplementären Gegenstrang (z. B. der passenden Sonde) zu hybridisieren.

#### 4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe dieses molekulargenetischen Verfahrens lassen sich bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen. Wir amplifizierten damit verschiedene Superantigen kodierende Gene von Gruppe-A-Streptokokken, um sie als Sonden an chromosomaler DNA von C- und G-Streptokokken einzusetzen. Die dafür benötigten chemisch synthetisierten Primer sind in Tabelle 4-2 unter Angabe der Nucleotidsequenz aufgeführt:

A	5'- CCATGGGTTTTAAATGAAAACAAACATTTTGAC -fw (ms G)
B	5'- CCATGGTAATGGATGAAAATTTAAAAGATTTAAAAAGAAG - fw os (G)
C	5'- AGATCTGTGCGTTTTTAAGTAGATATCAAATGAC - rv (G)
D	5'- CACCATGGATGAAATATTTAAAAGATTTGAAAGCAAG - fw os (G)
E	5' - TTCCATGGTAATGCAAGAGGTATTTGCTCAAC - fw (A)
F	5' - GGATCCCTTGGTTGTTAGGTAGACTTC - rv (A)
G	5' - CCATGGTATAAATGAAAAAGATTAACATCATCAAATAG - fw (C)
H	5' - AGATCTTTTTTCAAGATAAATATCGAAATGAC - rv (C)
I	5' - CGATAGTCAGCAAGTATATCTACAAAATTGTTAATG - fw (Z)
J	5' - AACTGCAGTTAGGAGTCAATTTC - rv (Z)

**Tabelle 4-2**

Nukleotidsequenzen der für die Amplifizierung der SAG-Gene *speG* (G), *speA* (A), *speC* (C) und *smeZ* (Z) verwendeten Primer. Die Primer A, C, D, G, H und I sind abgeleitet vom Oklahoma *Streptococcus pyogenes* sequencing project des GAS-Stammes SF370 (Ferretti et al., 2001). Primer E und F entstammen der GAS-DNA-Sequenz mit der Zugriffsnummer U40453.

Die Primer A, C, D, G, H und I wurden konstruiert aus den Sequenzdaten vom Oklahoma *Streptococcus pyogenes* sequencing project des GAS-Stammes SF370 (Ferretti et al., 2001). Primer E und F entwickelten wir aus der GAS-DNA-Sequenz mit der Zugriffsnummer U40453.

Für die Sequenzreaktion, ein der PCR verwandter Teilschritt vor der eigentlichen Sequenzierung, wurden zusätzlich die Primer T7 und SP6 benutzt (siehe 4.9).

Zur Amplifikation diente ein Thermocycler Gene Amp PCR Systems 2400 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland). Gearbeitet wurde mit folgendem Reaktionsansatz unter Verwendung des Taq PCR Kits von Hybaid-AGS:

1 µl Template DNA  
 je 1 µl Primer fw/rv (1 µM)  
 1 µl dNTP-Mix (40 mM)  
 5 µl 10 x Puffer komplett  
 0,3 µl *Taq*-Polymerase  
 ad 50 µl Aqua bidest.

Nach anfänglicher Denaturierung von 3 min bei 95 °C wurde der Zyklus – Denaturierung 95 °C, 30 s; Primeranlagerung, je nach Primer 45 bis 55 °C, 30 s; Elongation 72°C, 2 min – 30 mal wiederholt.

#### 4.6 Herstellung der Gen-Sonden

Mit den in Tabelle 4-3 aufgeführten Primern wurden die gewünschten SAG-Gene aus der DNA von GAS-Stämmen, die diese bekanntermaßen enthalten, durch PCR vervielfältigt.

<i>Sonde</i>	<i>Primer</i>	<i>Template-DNA von GAS-Stamm</i>
<i>speG</i>	A, C	M1 40/58
<i>speA</i>	E, F	NY5
<i>speC</i>	G, H	M5 Manfredo
<i>speZ/smeZ</i>	I, J	M1 40/58

**Tabelle 4-3**

Darstellung der für die Herstellung der Sonden durch PCR als Template benutzten GAS-Stämme und verwendete Primer.

Anschließend erfolgte eine Einengung der amplifizierten DNA-Fragmente auf eine Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l. Von dieser Lösung haben wir jeweils 10  $\mu$ l für die eigentliche Sonde weiter verarbeitet.

Nach Spaltung des Doppelstrangs in 5 min bei 95 °C und Markierung mit Meerrettich-Peroxidase durch Zugabe von 10  $\mu$ l gelöster Peroxidase (labelling agent) und 10  $\mu$ l Glutaraldehyd aus dem ECL-Kit System von Amersham Life Science stehen die Sonden zur Hybridisierung zur Verfügung. Sie sind derart aktiviert nicht haltbar und müssen deshalb sofort benutzt werden.

#### **4.7 DNA-Hybridisierung**

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, ist zunächst eine Vorhybridisierung (Blocking) notwendig. Dazu wurde die beladene Nylonmembran (siehe 4.4) in ein geeignetes Hybridisierungsröhrchen (BIOMETRA) eingelegt und in ca. 0,25 ml/cm<sup>2</sup> vorgewärmter Hybridisierungslösung (0,5 M NaCl, 5 % Blocking agent) gebadet. Nach einer Stunde kontinuierlicher Benetzung in einem Rotationsofen bei 42 °C erfolgte die Zugabe der Peroxidase markierten Sonde (siehe 4.6). Unter weiterer ständiger Drehung verblieben die Röhrchen zur Inkubation über Nacht im Hybridisierungsofen.

Am nächsten Tag entfernten wir die Hybridisierungslösung und ersetzten sie durch eine Primärwaschlösung (6 M Harnstoff, 0,5 x SSC, 0,4 % SDS; nach ECL-Kit, Amersham). Damit wurden die Membranen in Schritten je einmal 20 min und zweimal je 10 min gewaschen. Anschließend erfolgten noch zwei weitere Spülungen für je 5 min mit 2 x SSC-Puffer bei Raumtemperatur.

Die gewaschenen Nylonmembranen wurden nun in eine Schale gegeben und eine Minute mit den unmittelbar zuvor gemischten Detektionslösungen I und II des ECL-Kits bedeckt. Lösung I beinhaltet das Substrat Wasserstoffperoxid, welches bei Hybridisierung der Sonde an die Probe-DNA durch die an die Sonde gebundene Peroxidase gespalten wird. Die Reduktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch das Enzym ist verbunden mit einer lichtproduzierenden Reaktion, die durch das Luminol aus Lösung II ermöglicht wird.

Diese Chemolumineszenz kann in einer lichtdichten Kassette durch Schwärzung eines Röntgenfilmes (Hyperfilm – ECL) sichtbar gemacht werden. Die Belichtungszeiten lagen

durchschnittlich bei 2 Stunden; die Entwicklung erfolgte je nach Grad der Schwärzung zwischen 30 s und 2 min manuell. Für die in Abschnitt 5.1 enthaltenen Abbildungen wurden die belichteten Filme mit einem GS 690 Imaging Dosimeter von BIO-RAD digitalisiert.

Hybridisierte Blots können durch Einschweißen in Folie (zur Verhinderung von Austrocknung) haltbar gemacht werden. Nach Abwaschen der gebundenen Sonden mittels Wässerung in 1 Liter 0,4 M NaOH bei 45 °C für 30 Minuten und anschließender Spülung mit Neutralisationspuffer (0,5 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5) ist es möglich, die fixierte einsträngige DNA für neue Hybridisierungen zu benutzen.

#### **4.8 Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli***

Die durch PCR mit Taq-Polymerase gewonnenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einprozentigem Agarose-Gel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen Hilden, Deutschland) extrahiert. Die gebundene DNA eluierten wir von den Säulen mit 50 µl Aqua dest. oder 0,01 M Tris-HCL-Puffer pH 7,2.

Mit Taq-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente besitzen A-Überhänge und lassen sich so direkt in kommerzielle, speziell modifizierte Plasmide mit T-Überhängen (T-Klonierung) ligieren. Dazu wurde zunächst das Amplifikat in der Vakuumentrifuge eingeengt, dann erfolgte über Nacht bei 4 °C die Ligation in das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T easy gemäß folgendem Ansatz (Promega Fast Link):

ca. 5 µl	PCR-Fragment
0,5 µl	Vector pGEM <sup>®</sup> -T easy
1,5 µl	Ligase
8 µl	2 x Puffer
ad 16 µl	Aqua dest.

Anschließend wurde das Ligationsgemisch, wie im Protokoll von Promega beschrieben, durch einen 90-sekündigen Hitzepuls von 42 °C in die chemisch kompetenten Zellen des Stammes JM109 (Promega) transformiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Bouillon folgte unter leichtem Schwenken eine einstündige Inkubation bei 37 °C, bevor je 200 µl dieser Suspension auf

LB/A-Platten ausgespatelt wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen konnten wir die Ampicillin resistenten Klone isolieren und in einer neuen Übernachtkultur mit LB/A-Bouillon vermehren.

Zum Test, ob die Klone das gewünschte Insert enthalten, wurden Minipräparationen der Plasmid-DNA (Plasmid Mini Kit, Qiagen) angefertigt und diese durch Einsatz als Template in einer erneuten PCR mit den gleichen Primern bzw. durch Sequenzierung geprüft.

#### 4.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen erfolgten entweder direkt aus dem PCR-Gemisch oder nach oben beschriebener Subklonierung durch die Dideoxi-Methode (Sanger et al., 1977).

Verwendet haben wir dafür den Big Dye Termination Cycle Sequencing Kit 2.0 (Applied Biosystems), der die Polymerase und den Nukleotid-Mix (mit Rhodamin-gekoppelten Nukleotiden, die den Kettenabbruch verursachen) enthält. Zusätzlich wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt, welches eine Trennung der zu analysierenden DNA-Stränge bewirkt und das Ergebnis der Sequenzreaktion vor allem bei C/G-reichen Sequenzen verbessert.

Mit den erforderlichen, 1 : 10 (0,1 µg/µl Primer DNA) verdünnten Primern (für Sequenzierungen aus pGEM<sup>®</sup>-T easy SP6 und T7, siehe Tabelle 4-4) und 0,5 µg Template DNA (z.B. Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T easy mit Insert) erfolgte zuerst die Sequenzreaktion (25 Zyklen aus 10 s Denaturierung 96 °C, 5 s Primeranlagerung 50 °C, 4 min Extension 60 °C) im Thermocycler (GeneAmp PCR-System 2400, Perkin Elmer).

T7	5' GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - fw
Sp6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC - rv

**Tabelle 4-4**

Für die Sequenzreaktionen aus dem Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T easy benutzte Primer.

Später wurden die Proben im Sequenzautomat ABI PRISM 310 von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland), wie in den Handbüchern der Firma vorgeschrieben, analysiert. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, empfiehlt sich im nachhinein eine Kontrolle und gegebenenfalls manuelle Korrektur der automatisch berechneten Sequenzen. Dazu dienten die Programme Genetic Analyzer und Sequenz Navigator von PE Applied Biosystems.

## 4.10 Klonierung in Expressionsvektoren

Die Sequenzanalysen verschiedener PCR-Fragmente, erzeugt mit den Primern für *speg* von GAS und DNA von Gruppe-G-Streptokokken als Template, ergaben einen offenen Leserahmen, dessen Gen wir *speg<sup>dys</sup>* benannten. Das kodierte Protein SPEG<sup>dys</sup> versuchten wir rekombinant zu exprimieren. Dazu wurden die entsprechenden Subklone der PCR-Fragmente mit Restriktionsendonukleasen gespalten und in den gleichermaßen restringierten Vector pQE 50 der pQE 50/51/52 Serie (QIAGEN) ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli* Expressionsstamm M15 (pRep4). Nach Inkubation wurden die Ampicillin- und Kanamycin resistenten Transformanten durch Minipräparation und Sequenzierung auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts geprüft (siehe auch 4.8)

Von den positiven Klonen wurden jeweils zwei parallele 2 ml Kulturen angelegt und 3 Stunden unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Dann gaben wir zu einer der Parallelkulturen IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM entsprechend dem Protokoll von QIAGEN, um die Expression zu induzieren. Die Plasmide der pQE Reihe zählen zu Expressionssystemen, die es erlauben, hohe Expressionsraten rekombinanter Proteine zu erzielen. Meist kann die Expression schon im Vergleich zur nicht mit IPTG behandelten Probe im gefärbten SDS Gel nachgewiesen werden.

Da ein solcher Expressionsnachweis (siehe 5.3) mit obiger Plasmidkonstruktion nicht gelang, führten wir mehrere Wiederholungen dieses Schrittes durch, auch mit unterschiedlichen Konfigurationen des Gens *speg<sup>dys</sup>* (mit und ohne Signalsequenz) und unter Verwendung weiterer Expressionssysteme. So wurde z. B. der Versuch unternommen, durch Insertion des Gens *speg<sup>dys</sup>* in andere Plasmide der pQE-Reihe (pQE60, pQE32) ein SPEG<sup>dys</sup>-His-Tag Fusionsprotein zu konstruieren, um den Nachweis der Expression zu vereinfachen.

## 4.11 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um in *E. coli* Kulturen exprimierte Proteine analysieren zu können, werden die Bakterien zunächst abzentrifugiert und das Sediment aus 2 ml Kultur in 0,1 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 8,0 suspendiert und dazu noch 0,1 ml SDS-Probepuffer (0,01 M Tris, 1 mM EDTA, 2 % m/v SDS, 40 % v/v Glycerin, 2 % Mercaptoethanol, 0,1 % m/v Bromphenolblau, pH 8) zugegeben. Nach 5 min Erhitzen bei 95 °C wurden je 15 bis 20 µl des Lysates elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer

(BIORAD) nach der Vorschrift von Laemmli (1970). Dabei wurden ein Tris-Glycinpuffer (10 mM Tris, 0,1 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) und 12,5 prozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Laufzeit betrug 2 h bei 90 V.

Mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau R250, gelöst in einem Ethanol-Eisessig-Wasser Gemisch, können die aufgetrennten Proteine im Gel sichtbar gemacht werden.

#### **4.12 Proteinnachweis im Western Blot**

Das Westernblotting ist eine Methode, mit der Proteine auf eine feste Matrix wie Nitrocellulosemembrane (NC-Membrane) transferiert werden können. Dort binden sie adhäsiv und sind so immunologischen Bindungstests zugänglich. Diese sind wesentlich empfindlicher als eine unspezifische Proteinfärbung.

Wir übertrugen das im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemisch mit Hilfe eines Blot-Puffersystems (0,3 M Tris, 0,1 M Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) in einer Tank-Blot-Apparatur der Firma Biorad. Diese zweite Elektrophorese erfolgte innerhalb von 2 h bei 250 mA. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Membranen mit Ponceau-Rot im sauren Milieu gebadet. Die Färbung der Proteine bleibt auf den getrockneten Folien längere Zeit erhalten, sie ist aber reversibel und kann jederzeit durch Spülung mit basischen Puffern wie 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) für eine immunologische Färbung wieder entfernt werden.

Um beim immunologischen Nachweis unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, behandelten wir die Membrane zunächst 10 min in einer Lösung aus 1 % Magermilch in PBS-Puffer mit 0,01 % Tween 20 (PBST). Daraufhin wurden die geblockten Folien über Nacht mit dem primären Antikörper Anti-SPEG vom Kaninchen (erzeugt gegen SPEG von Gruppe-A-Streptokokken, und von Dr. D. Gerlach zur Verfügung gestellt) in einer Konzentration von ca. 1:500 in 1 % Magermilch/PBST inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit reichlich PBST erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase markierten sekundären Antikörper. Wir verwendeten Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein der Firma DAKO Diagnostika in einer Verdünnung von 1 : 2000. Bei Konstruktionen, in denen ein SPEG-His-Tag Fusionsprotein exprimiert werden sollte, benutzten wir als ersten Antikörper den Peroxidase markierten monoklonalen Antikörper anti-penta-His (Verdünnung 1 : 2000) der Firma Qiagen, mit dem der Nachweis der His-Tag Region in einer Stufe durchgeführt werden kann.



Vor dem Peroxidasenachweis wurden die Membranen wiederum dreimal mit PBST gewaschen, und zuletzt mit einem Acetatpuffer (0,1 M Natriumacetat, pH 4,5) ein saures Milieu geschaffen. Darin erfolgte der Nachweis des Enzym markierten Immunkomplexes mit dem Peroxidasesubstrat 3-Amino-9-ethyl-carbazol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. und 10 min Lagerung in Natriumthiosulfat-Fixierlösung konnten die Folien getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

#### **4.13 Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Mit dem Lymphozytentransformationstest kann die Proliferation von Lymphozyten nach Antigenstimulation quantitativ erfasst werden.

Die erforderlichen menschlichen Blutlymphozyten gewannen wir durch Dichtegradientenzentrifugation (Dichte 1,077 g/cm<sup>3</sup>) unter Verwendung von Ficoll hypaque (Biochrom). Nach Einstellung einer Zellkonzentration von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Milliliter im Kulturmedium erfolgte die Ausbringung von 100 µl Zellsuspension je Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Dazu gaben wir 5 µl der auf Mitogenität zu untersuchenden Probe. Bei der Negativkontrolle unterblieb dieser Zusatz, bei der Positivkontrolle wurde die proliferative Antwort durch Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA, Endkonzentration 3 µl/ml) induziert. Anschließend kamen die Proben in einen CO<sub>2</sub>-Brutschrank zur Inkubation.

Die Proliferationsmessung erfolgte kontinuierlich über drei bis fünf Tage mit dem Gerät Casy TT der Firma Schärfe System Reutlingen, das sowohl die Zellzahl als auch das Zellvolumen bestimmen kann.

Untersucht wurden mit diesem Verfahren der Überstand einer Übernachtskultur des Stammes 39072 sowie Überstand und Zell-Lysat einer mit Streptokokken dieses Stammes infizierten 2-Tage-Kultur von menschlichen Hep-2-Epithelzellen.

#### **4.14 Verwendete Software**

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Macintosh Software (Genetic Analyzer, Sequenz Navigator) von PE Applied Biosystems. Zur weiteren Analyse von

Nuclein- und Aminosäuresequenzen wurden die Programme SEQAID und PCGENE benutzt. Externe Sequenzdaten entstammen der NCBI-Datenbank.

Die Bearbeitung der Grafiken und Bilder geschah mit dem Micrografx Picture Publisher 7, Beschriftungen und Layout z. T. auch mit PowerPoint 2000. Ebenfalls von Microsoft stammt das Programm Word 2000, mit dem diese Arbeit konzipiert und erstellt wurde.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Hybridisierung von GCS und GGS mit Superantigen kodierenden Sonden

Die grundsätzliche Ähnlichkeit verschiedener Pathogenitätsfaktoren von A-Streptokokken und solcher von Gruppe C- und G-Streptokokken wie Streptokinase (Malke et al., 1985), C5a-Peptidase (Cleary et al., 1991), M-Protein (Schnitzler et al. 1995; Geyer et al., 1999) sowie die zunehmende Isolation von C- und G-Streptokokken bei Patienten mit schweren Infektionen und toxischem Schock (Keiser und Campbell, 1992; Natoli et al., 1996; Wagner et al., 1996; Roth et al., 1999) ließen uns vermuten, dass GCS und GGS ebenfalls Gene besitzen könnten, die Superantigene kodieren.

Um diese These zu belegen, wurde die DNA von 7 GCS- und 17 GGS-Stämme aus der Stammsammlung der FSU Jena auf das Vorhandensein der Gene von drei seit längerem bekannten Superantigenen von GAS – den Proteinen SPEA, SPEC, SPEZ/SMEZ – sowie einem relativ neu beschriebenen Superantigen – SPEG (Proft et al., 1999) – untersucht. Zum Vergleich und als Kontrolle diente die DNA von vier GAS-Stämmen, von denen jeder Träger mindestens dreier obengenannter Superantigen-Gene ist. Zusätzlich wurden auch zwei GBS-Stämme mit untersucht (siehe 4.1 bzw. 4.10).

Zum Screening benutzten wir die Methode der Dot-Blot-Hybridisierung. Zunächst wurde die zu untersuchende, chemisch denaturierte chromosomale DNA an eine Nylonmembran gebunden. Nach Aufspaltung der entsprechenden DNA-Sonden in Einzelstränge durch Erhitzen ist dann eine Hybridisierung an die membrangebundene DNA möglich. Die Markierung der Sonden mit Meerrettich-Peroxidase (siehe 4.6) erlaubt später die Sichtbarmachung einer Hybridisierung: Bei erfolgreicher Bindung wird das verwendete Peroxidase-Substrat oxidiert und schwärzt durch den Einsatz des spezifischen Chemolumineszenzverstärkers Luminol einen Röntgenfilm.

Als Sonden wurden die aus A-Streptokokken amplifizierten SAG-Gene *spea*, *spec*, *spez* und *speg* verwendet. Die Herstellung erfolgte durch PCR mit den unter 2.4 und 4.6 aufgeführten Primern (siehe Tabelle 4-3). Die Sequenzen der Primer für die Sonden *speC* (G, H), *speZ* (I, J) und *speG* (A, C) wurden der Genomsequenz des GAS-Stamm SF370 (Ferretti et al., 2001)

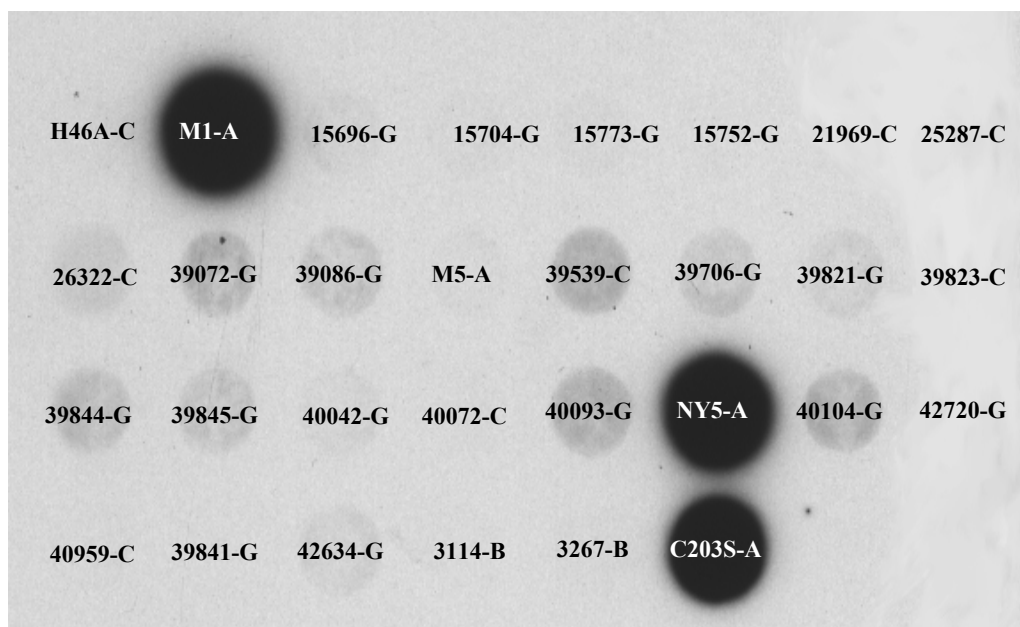
abgeleitet, der die entsprechenden Gene besitzt. Die Primer E und F für *speA* haben wir aus der Sequenz eines GAS-Stammes mit der NCBI-Zugriffsnummer U40453 konstruiert.

### **Reaktion mit der Sonde *speA***

Mit der Sonde für das Gen *speA* fanden wir eine deutliche Schwärzung im Bereich der DNA-Proben der GAS-Kontrollstämme M1, NY5 und C203S (Abbildung 5-1). Diese 3 Stämme besitzen demnach die genetische Information für das Superantigen SPEA, nicht jedoch der GAS-Stamm M5.

Bei keinem der untersuchten GCS/GGS- und GBS-Stämme war ist eine Hybridisierung nachweisbar. Sie besitzen folglich kein dem Gen für das Superantigen SPEA verwandtes Gen.

Schwache, in ihrer Intensität aber deutlich von den wirklich positiven Proben unterscheidbare Dots stehen meist für wenige kurze Hybridisierungsabschnitte, die kein intaktes SPEA-Gen darstellen. Belegt wird dies auch dadurch, dass mit der DNA dieser Stämme keine *speA*-spezifische PCR gelang.

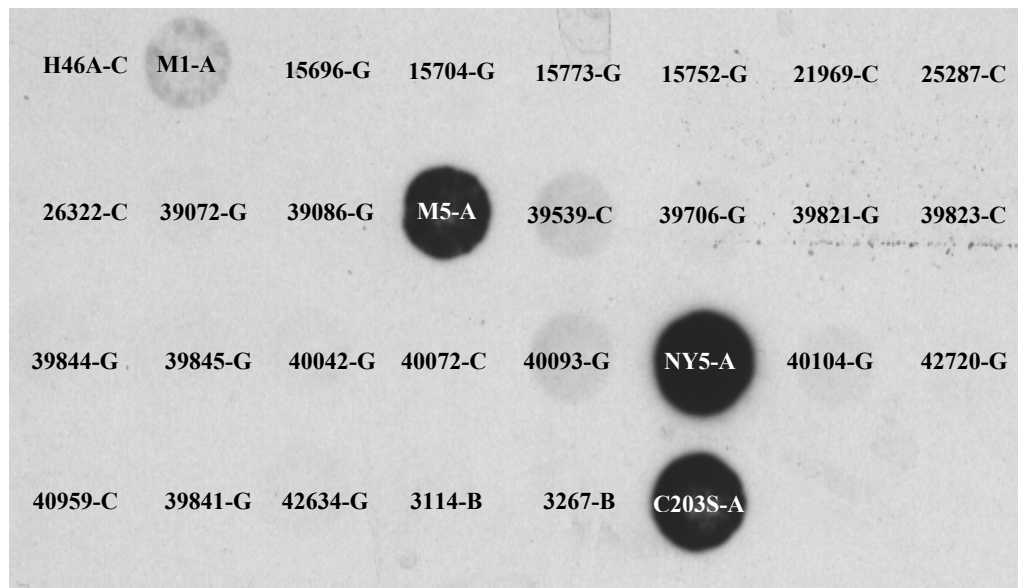


**Abbildung 5-1**

Dot-Blot-Hybridisierung der Sonde *speA* mit der membrangebundenen chromosomalen DNA der zu untersuchenden Stämme, jeweils Stammmnummer und serologische Gruppe.

### Reaktion mit der *speC*

Der Hybridisierungsversuch mit der *speC*-Sonde (Abbildung 5-2) ergab ein ähnliches Bild wie oben mit *speA*. Wiederum bei 3 GAS Stämmen erfolgte eine Bindung, sie enthalten also das Gen *speC*. Allerdings zeigte sich auch, dass die Anwesenheit der SAG-Gene variiert, denn der *speA*-positive Stamm M1 besitzt, wie die negative Hybridisierung offenbart, nicht das Gen *speC*.



**Abbildung 5-2**

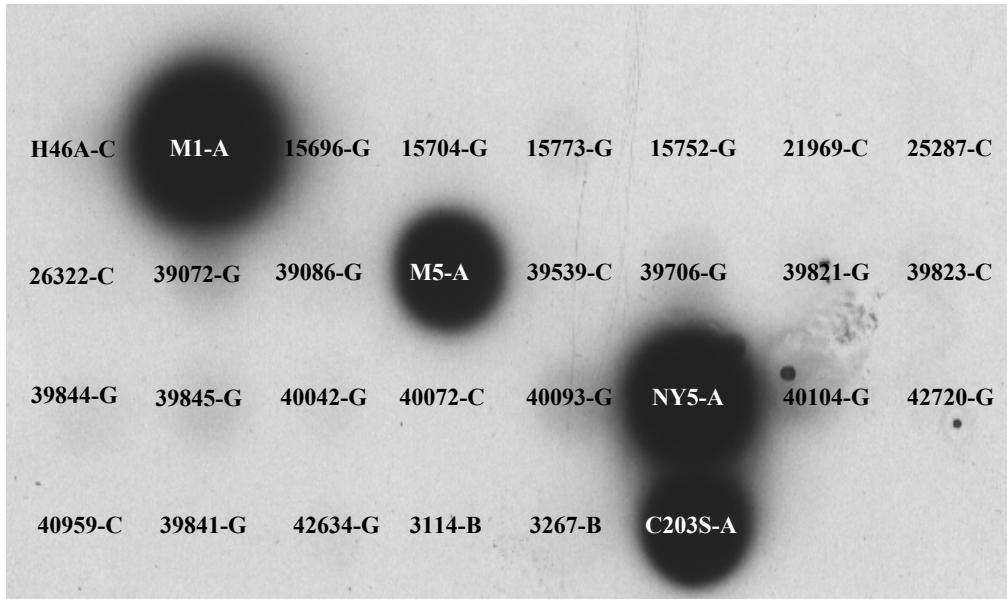
Dot-Blot-Hybridisierung der Sonde *speC* mit der membrangebundenen chromosomalen DNA der zu untersuchenden Stämme, jeweils Stammnummer und serologische Gruppe.

Mit den anderen Proben – der chromosomalen DNA der GCS- und GGS-Stämme wie auch der B-Stämme – konnte die Sonde nicht hybridisieren. Das Gen für das Superantigen SPEC oder ein dem ähnliches Gen ist demzufolge auf dem Chromosom der untersuchten C-, G- und B-Streptokokken-Stämme nicht lokalisiert.

### Reaktion mit der Sonde *speZ/smeZ*

Eine Bindung der Sonde *speZ/smeZ* fanden wir an die DNA aller GAS-Stämme (Abbildung 5-3). Das bedeutet, alle hier untersuchten A-Streptokokken-Stämme besitzen das Gen für das Superantigen SPEZ/SMEZ.

An die DNA der Streptokokken der anderen serologischen Gruppen erfolgte keine Hybridisierung, das Gen *speZ/smeZ* ist demnach bei den untersuchten GCS/GGS- und GBS-Stämmen nicht vorhanden.

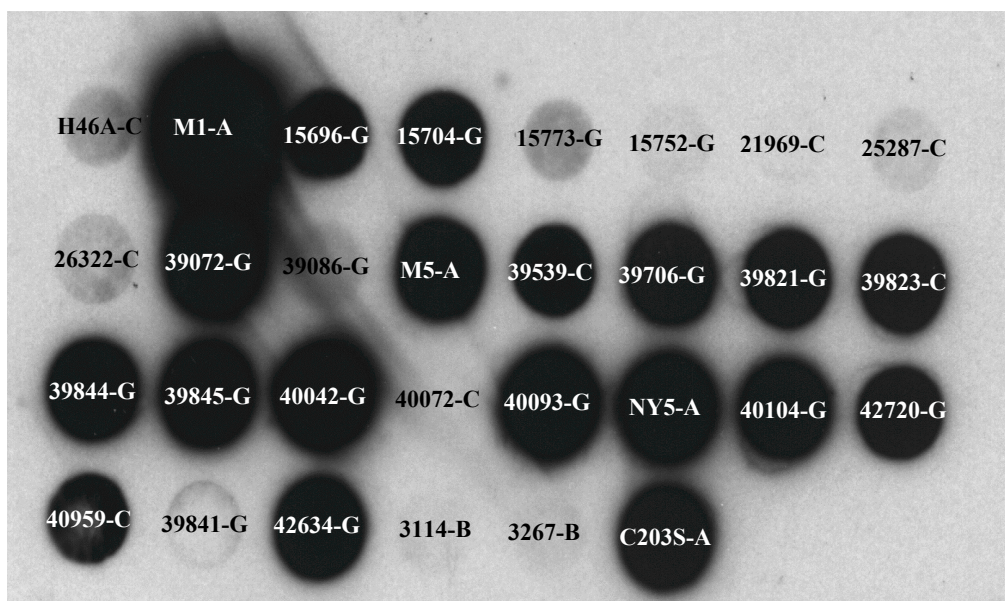


**Abbildung 5-3**

Dot-Blot-Hybridisierung der Sonde *speZ/smeZ* mit der membrangebundenen DNA der zu untersuchenden Stämme, jeweils Stammnummer und serologische Gruppe.

### Reaktion mit der Sonde *speG*

Ein völlig anderes Bild ergab die Prüfung auf das Gen *speG*. Die DNA-Dots von deutlich mehr Stämmen zeigten Schwärzungen des Röntgenfilms (Abbildung 5-4). Wie mit der Sonde *speZ/smeZ* reagieren auch alle GAS-Proben mit der Sonde *speG*.



**Abbildung 5-4**

Dot-Blot-Hybridisierung der Sonde *speG* mit der membrangebundenen chromosomalen DNA der zu untersuchenden Stämme, jeweils Stammnummer und serologische Gruppe.

Von besonderem Interesse sind allerdings die Bindungen an die DNA der GCS/GGS-Stämme. Die positiven Reaktionen ließen die Vermutung zu, dass viele der untersuchten C- und G-Streptokokken das Gen für das Superantigen SPEG besitzen.

Für B-Streptokokken fiel die Untersuchung dagegen wiederum negativ aus.

Geringe Belichtungen an den Stellen einiger (negativer) Proben können durch schwache Affinität zwischen Sonde und DNA auf Grund von niedrigeren Sequenzhomologien erklärt werden (siehe auch 0).

Bei genauer Analyse der Reaktion der Sonde *speG* mit der C- und G-Streptokokken-DNA fällt auf, dass wesentlich mehr GGS-Stämme positive Hybridisierungen aufweisen. Während das Verhältnis positiver Bindungen zu negativen Reaktionen bei Gruppe-C-Streptokokken nur 1 zu 3 ist, stellt sich diese Relation bei GGS nahezu umgekehrt dar. Anders ausgedrückt, lediglich knapp 30 % der untersuchten C-Streptokokken-Stämme, aber mehr als 75 % der untersuchten G-Streptokokken-Stämme enthalten in ihrem Erbgut das Gen *speG* (siehe Tabelle 5-1).

Serogruppe	Anzahl der Stämme	positiv		negativ	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
C	7	2	28,6 %	5	71,4 %
G	17	13	76,5 %	4	23,5 %
A	4	4	100,0 %	0	0,0 %
B	2	0	0,0 %	2	100,0 %

**Tabelle 5-1**

Reaktionen der Sonde *speG* mit der DNA der untersuchten Streptokokkenstämme – nach Serogruppen sortiert.

Trotz dieses offensichtlichen Unterschiedes ist die statistische Wahrscheinlichkeit, dass *speG*-positive Stämme bei C- und G-Streptokokken eventuell doch gleich häufig vorkommen, zwar sehr gering (exakter Fisher-Test  $p = 0,06$ ), erreicht aber nicht die für Signifikanz nötige Marke von weniger als 5 Prozent.

### Zusammenfassung der Hybridisierungsreaktionen

Die Gene der Superantigene SPEA, SPEC, SPEZ/SMEZ und SPEG sind bei Streptokokken der Gruppe A am weitesten verbreitet: die Hälfte der untersuchten Stämme enthält alle, beim Rest fehlt nur jeweils ein Gen. Im Gegensatz dazu besitzen die beiden B-Streptokokken-Stämme keines der gesuchten SAG-Gene. Diese Befunde stimmen mit bereits vorhandenen Ergebnissen (Reichardt et al., 1992; unveröffentlicht Schmidt und Günther, 2000) überein.

serologische Gruppe	Stammnummer	Reaktion mit Sonde			
		<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speZ/smeZ</i>	<i>speG</i>
A	C203S	+	+	+	+
	M1 40/58	+	-	+	+
	M5 Manfredo	-	+	+	+
	NY5	+	+	+	+
C	21969	-	-	-	-
	25287	-	-	-	-
	26322	-	-	-	-
	<b>39823</b>	-	-	-	+
	40072	-	-	-	-
	<b>40959</b>	-	-	-	+
	H46A (CG1)	-	-	-	-
G	15696	-	-	-	+
	<b>15704</b>	-	-	-	+
	15752	-	-	-	-
	15773	-	-	-	-
	<b>39072</b>	-	-	-	+
	39086	-	-	-	-
	<b>39539</b>	-	-	-	+
	<b>39706</b>	-	-	-	+
	<b>39821</b>	-	-	-	+
	39841	-	-	-	-
	<b>39844</b>	-	-	-	+
	<b>39845</b>	-	-	-	+
	<b>40042</b>	-	-	-	+
	<b>40093</b>	-	-	-	+
	<b>40104</b>	-	-	-	+
<b>42634</b>	-	-	-	+	
42720	-	-	-	+	
B	B3114	-	-	-	-
	B3267	-	-	-	-

**Tabelle 5-2**

Ergebnisse der Hybridisierungen der verschiedenen Sonden mit der DNA der untersuchten A-, C-, G- und B-Streptokokken-Stämme: (-) keine Reaktion, (+) positive Reaktion.

Die DNA der GCS/GGS reagierte nur mit der Sonde *speG*. Stämme mit positiver Hybridisierung sind fett gedruckt.



Völlig neu aber ist der Nachweis eines SAG-Gens bei GCS- und GGS-Stämmen. Zwar konnten wir die Gene der „klassischen“ Superantigene SPEA, SPEC und SPEZ/SMEZ in den untersuchten GCS/GGS-Stämmen nicht finden, die Sonde *speG* für das Gen des von Proft et al. 1999 neu beschriebenen SPEG zeigte jedoch bei einem Viertel der C- und bei drei Viertel der G-Streptokokken-Stämme eine positive Reaktion, die auf das Vorhandensein dieses Genes hindeutet.

Einen Überblick über alle Hybridisierungsversuche gibt die Tabelle 5-2. Speziell hervorgehoben sind dabei die positiven Reaktionen bei den GCS/GGS-Stämmen.

## **5.2 Sequenzanalyse des Gens *speG* aus dem GGS-Stamm 39072**

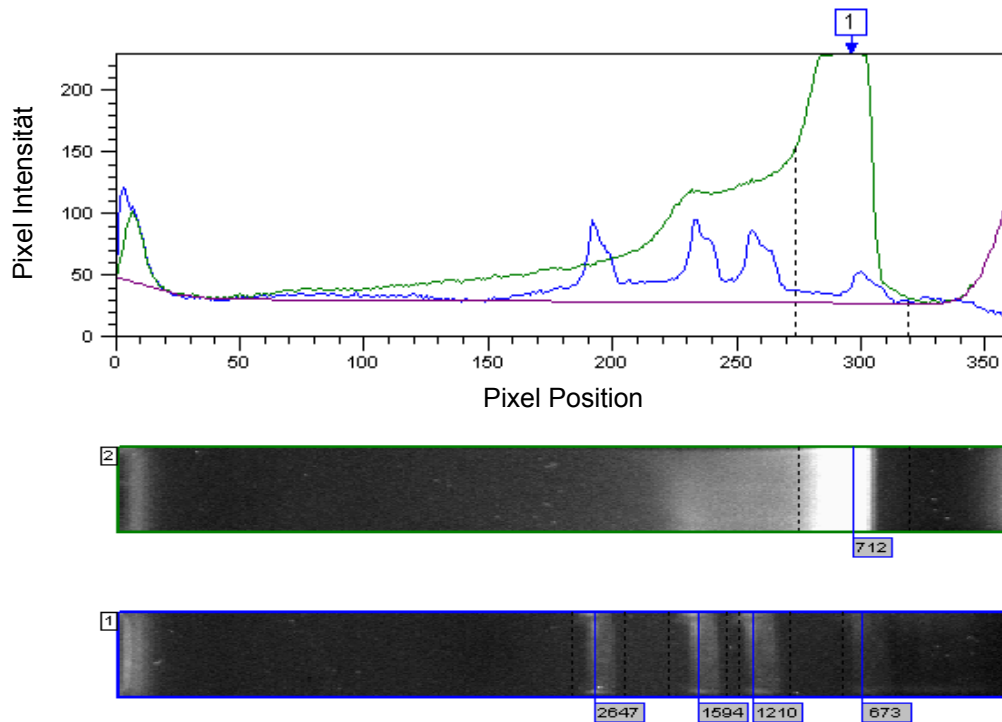
Um zu bestätigen, dass die positiven Hybridisierungen der Sonde *speG* mit der GCS- und GGS-DNA auch die Anwesenheit eines *speG*-ähnlichen Gens bei den entsprechenden Stämmen anzeigen, waren weitere Analysen notwendig. Wir wählten dafür einen Stamm mit stark positiver Hybridisierung aus, den GGS-Stamm 39072.

Zunächst wurde versucht, das potentielle *speG*-Gen in GGS durch PCR zu amplifizieren, um später eine exakte Sequenzanalyse durchführen zu können.

### **Amplifizierung durch PCR**

Mit der DNA des GGS-Stamms 39072 als Template und den *speG*-Primern A und C führten wir wie unter 4.5 beschrieben eine PCR durch. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches in der Agar-Gelelektrophorese ergab eine scharfe Bande (Bahn 2 in Abbildung 5-5), was eine erfolgreiche Amplifizierung anzeigt.

Mit dem Programm Image Master 1 D Elite (Amersham Pharmacia Biotech) ließ sich durch Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsmarker die Größe des amplifizierten DNA-Abschnitts bestimmen. Mit berechneten 712 Basenpaaren entspricht sie sehr gut der Größe des Gens *speG* in A-Streptokokken (*speG*<sup>GAS</sup> – 705 Bp).



**Abbildung 5-5**

Amplifizierung eines Fragmentes aus der DNA des Stammes 39072 mit den *speg*<sup>GAS</sup>-Primern A und C durch PCR.

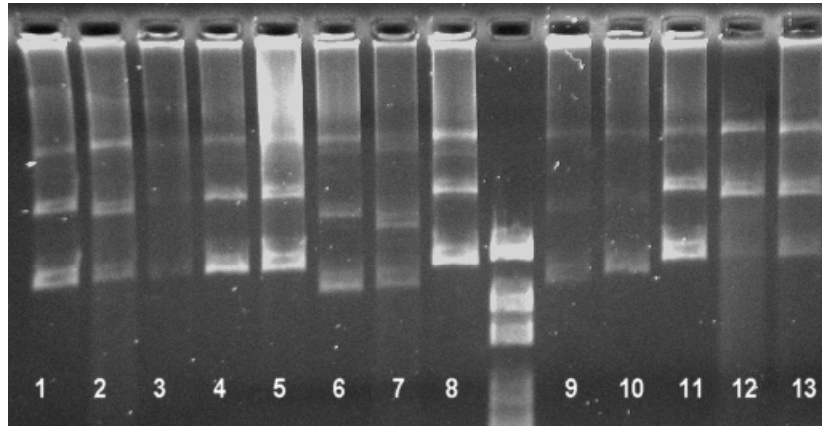
Auswertung der Elektrophorese mit dem Programm Image Master 1 D Elite:  
oben grafische Darstellung des Intensitätsverlaufes, unten die Fragmente im Gel

Bahn 1: pGEM-Marker mit Zuordnung der Molekülgröße (Basenpaare) zu den Banden  
Bahn 2: amplifiziertes DNA-Fragment mit errechneter Molekülgröße

### Zwischenklonierung

Für die nachfolgende Sequenzanalyse zur Ermittlung der vollständigen Gensequenz des Amplifikates einschließlich der Primerbindungsregion wurden die PCR-Fragmente in den Vector pGEM<sup>®</sup>-T easy ligiert und anschließend in den *E. coli* Stamm JM 109 transformiert (siehe 4.8). Die Prüfung der Klone auf ein Insert erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Plasmidpräparationen (Abbildung 5-6).

Entscheidend für die Auswertung in diesem Falle ist die unterste Bande im Plasmidmuster. Plasmidisolate, bei denen diese ein erhöhtes Molekulargewicht aufweist, sind mögliche Träger des Inserts. Eine Bande in der erwarteten Höhe wiesen die Klone 1 bis 5, 8, 11 und 13 aus Abbildung 5-6 auf. Die Klone 1, 8 und 13 wurden für die nachfolgenden Sequenzanalysen weiter untersucht.



**Abbildung 5-6**

Gelelektrophorese der Minipräparationen nach Zwischenklonierung der PCR-Fragmente in pGEM<sup>®</sup>-T easy im Stamm JM 109. Klone 1-13

### Sequenzierung

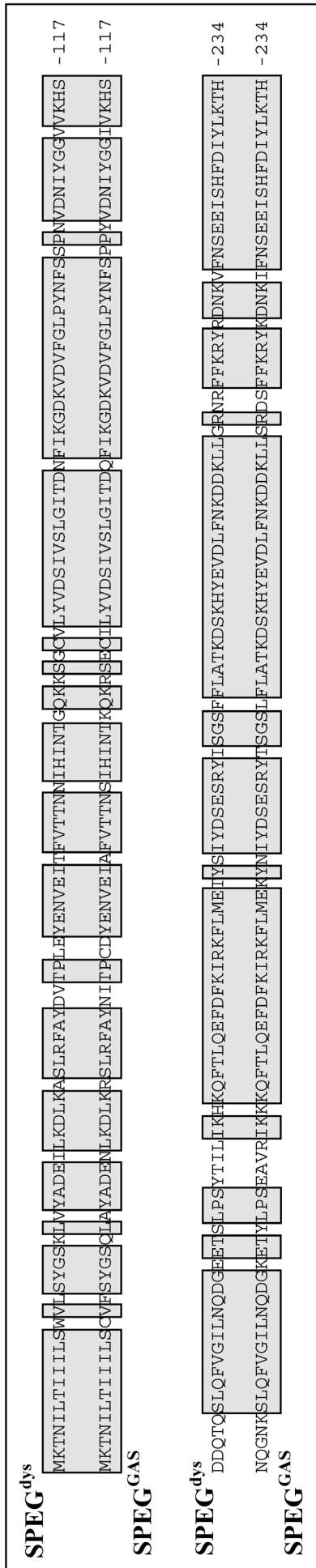
Bei Klon 8 gelang mit den Primern T7 und SP6 von beiden Seiten eine komplette Sequenzierung des Inserts aus dem Vector (siehe auch 4.9).

Besonders interessiert natürlich der Vergleich der neuen Sequenz mit der bekannten Sequenz von *speg*<sup>GAS</sup> der A-Streptokokken (Abbildung 5-7): Bis auf den Bereich zwischen den Basen 410 und 450 ließ sich ein hoher Grad von Homologie (85 % < 410, 93 % > 450) zwischen beiden Sequenzen feststellen. Damit ist klar, dass sich hinter der amplifizierten Sequenz aus dem Genom des GAS-Stammes 39072 ein dem *speg*<sup>GAS</sup>-Gen sehr ähnliches Gen verbirgt. Da diese neue *speg*-Sequenz erstmalig für einen GGS-Stamm (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) ermittelt wurde, wird sie im Folgenden „*speg*<sup>dys</sup>“ genannt. Unter dieser Bezeichnung wurde sie mit der Accessionsnummer AJ294849 auch der internationalen NCBI-Gendatenbank zur Verfügung gestellt.

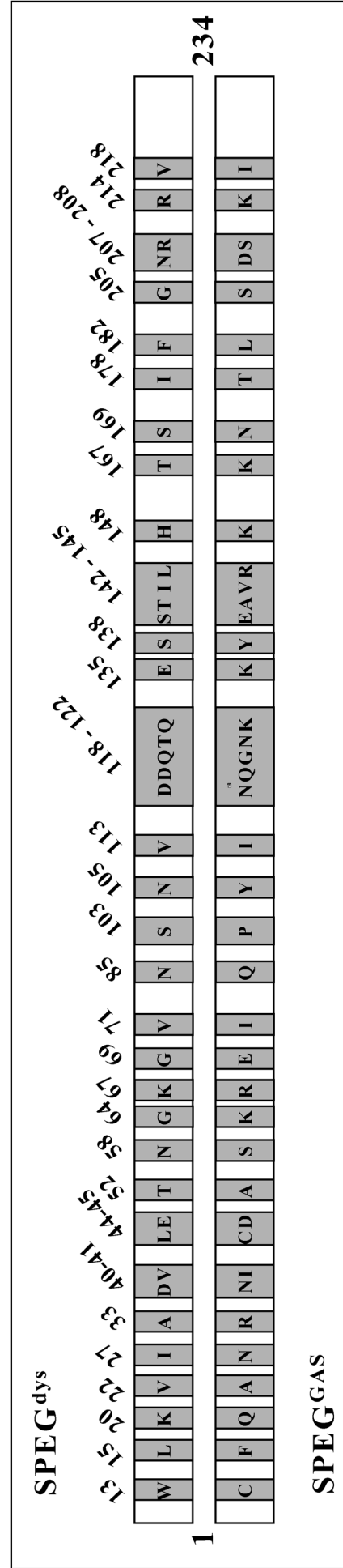
Der gefundene offene Leserahmen des Gens *speg*<sup>dys</sup> kodiert ein Protein, das wir SPEG<sup>dys</sup> bezeichneten. SPEG<sup>dys</sup> und SPEG<sup>GAS</sup> sind beide 234 Aminosäuren lang. Die Übereinstimmung beträgt 82,5 %, zuzüglich 4,7 % ähnlicher Aminosäuren. Die größten Differenzen bestehen in der Mittelregion zwischen den Positionen 117 und 149. In den Abbildungen 5-8 und 5-9 werden die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine miteinander verglichen und die Gemeinsamkeiten und Unterschiede verdeutlicht.

<i>speg<sup>dys</sup></i>	- ATGAAAACAAACATTTTGACAATTATCATATTGTCATGGGTTTTA	-45
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- ATGAAAACAAACATTTTGACAATTATCATATTATCATGTGTTTTT	-45
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- AGCTATGGAAGTAAATTAGTTTATGCGGATGAAATATTTAAAAGAT	-90
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- AGCTATGGAAGTCAATTAGCTTATGCAGATGAAAAATTTAAAAGAT	-90
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- TTGAAAGCAAGCTTAAGATTTGCTTATGATGTTACTCCACTTGAG	-135
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- TTAAAAAGAAGTTTAAGATTTGCCTATAATATTACCCCATGCGAT	-135
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- TATGAAAATGTAGAGATTACATTTGTTACTACGAACAATATACAT	-180
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- TATGAAAATGTAGAAATTGCATTTGTTACTACAAATAGCATAACAT	-180
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- ATTAATACTGGACAAAAGAAATCTGGATGCGTTTTATATGTTGAT	-225
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- ATTAATACTAAACAAAAAAGATCGGAATGTATTCTTTATGTTGAT	-225
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- TCTATTGTATCTTTAGGGATTACTGATAACTTTATCAAAGGGGAT	-270
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- TCTATTGTATCTTTAGGCATTACTGATCAGTTTATAAAAGGGGAT	-270
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- AAGGTAGATGTCTTTGGGCTCCCTTATAATTTTTTCATCACCCAAT	-315
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- AAGGTCGATGTTTTTGGTCTCCCTTATAATTTTTTCCCACCTTAT	-315
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- GTAGATAATATTTATGGTGGTGTGTGAAACATTCGGATGACCAA	-360
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- GTAGATAATATTTATGGTGGTATTGTA AACATTCGAATCAAGGA	-360
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- ACTCAATCATTACAGTTTGTAGGGATTTTAAATCAAGATGGAGAA	-405
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- AATAAATCATTACAGTTTGTAGGAATTTTAAATCAAGATGGGAAA	-405
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- GAAACCAGTCTCCCCTCTTATACTATTTTAAATAAAGCATAAGCAA	-450
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- GAAACTTATTTGCCCTCTGAGGCTGTTTCGCATAAAAAAGAAACAG	-450
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- TTTACTTTGCAAGAATTTGATTTTAAATAAGAAAAATTTCTAATG	-495
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- TTTACTTTACAGGAATTTGATTTTAAATAAGAAAAATTTCTAATG	-495
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- GAAACATACAGTATCTATGATTCGGAATCGCGTTATATATCGGGG	-540
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- GAAAAATACAATATCTATGATTCGGAATCGCGTTATACATCGGGG	-540
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- AGCTTTTTTCTAGCTACCAAAGATAGTAAACATTATGAAGTTGAT	-585
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- AGCCTTTTCCTTGCTACTAAAGATAGTAAACATTATGAAGTTGAT	-585
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- TTATTTAATAAGGATGATAAGCTTCTAGGTCGAAATCGTTTCTTT	-630
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- TTATTTAATAAGGATGATAAGCTTTTAAAGTCGAGACAGTTTCTTT	-630
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- AAAAGGTATAGAGATAATAAGGTTTTTAAATAGTGAAGAAATTAGT	-675
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- AAAAGGTATAAAGATAATAAGATTTTTTAAATAGTGAAGAAATTAGT	-675
<i>speg<sup>dys</sup></i>	- CATTTTGATATCTACTTAAAAACGCCTAG	-705
<i>speg<sup>GAS</sup></i>	- CATTTTGATATCTACTTAAAAACGCCTAG	-705

**Abbildung 5-7**  
 Alignment des neu nachgewiesenen Gens *speg<sup>dys</sup>* aus dem GGS-Stamm 39072 mit dem bekannten *speg<sup>GAS</sup>* der A-Streptokokken: bis auf den grau unterlegten Bereich zwischen den Basennummern 410-450 sehr gute Übereinstimmung.



**Abbildung 5-8**  
Alignment der Aminosäuresequenzen der Proteine SPEG<sup>dys</sup> des GGS-Stammes 39072 und SPEG<sup>GAS</sup> des Stammes SF370 (Ferretti et al., 2001). Die Übereinstimmungen sind grau unterlegt.



**Abbildung 5-9**  
Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Proteine SPEG<sup>dys</sup> und SPEG<sup>GAS</sup> mit Angabe der differierenden Positionen. Die Differenzen sind grau unterlegt, schräg darüber die jeweiligen Aminosäurenummern.

Wie hier mit dem Stamm 39072 demonstriert, wurden die *speG*-Gene weiterer Stämme amplifiziert und ansequenziert und ergaben die gleichen Ergebnisse (nicht illustriert). Das beweist, dass positive Reaktionen mit der Sonde *speG* bei der Hybridisierung die Anwesenheit eines *speG*-Gens anzeigen. Auch das Verfahren der Hybridisierung von Dot-Blots zum relativ einfachen Screening vieler Proben auf das Vorkommen einer bestimmten DNA-Sequenz wurde damit bestätigt.

### 5.3 Untersuchungen zur Expression von SPEG<sup>dys</sup>

Die enge Verwandtschaft des kodierten Proteins SPEG<sup>dys</sup> mit dem schon charakterisierten Superantigen SPEG<sup>GAS</sup> (Proft et al. 1999) lässt vermuten, dass beide Proteine ähnliche Eigenschaften aufweisen. Das heißt, dass wahrscheinlich auch SPEG<sup>dys</sup> als Superantigen wirken kann. Nachdem die Existenz der genetischen Information zur potentiellen Expression des Proteins SPEG<sup>dys</sup> in GGS über die Sequenzanalyse bestätigt wurde, war anschließend die Frage wichtig, ob sich in Kultur auch eine Expression des potentiellen Superantigens aufzeigen lässt.

#### Expression in GGS-Bakterien

Wie unter siehe 4.11 beschrieben, wurden sowohl das lysierte Sediment als auch der Überstand einer Übernachtskultur des Stammes 39072 elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die immunologischen Untersuchungen der Blots mit Anti-SPEG<sup>GAS</sup>-Antikörpern verliefen allerdings in allen Fällen negativ. Wegen der Homologie beider Proteine müßte man eine Kreuzreaktivität der Antikörper erwarten. Eine Expression bzw. das Vorhandensein des Proteins SPEG<sup>dys</sup> in der Streptokokkenkultur ließ sich im Immunoblot aber nicht nachweisen.

Um zu testen, ob SPEG<sup>dys</sup> eventuell in Anwesenheit von Humanzellen exprimiert wird, wurden menschliche Zellkulturen parallel mit zwei GGS Stämmen beimpft. Allerdings weder der Überstand einer Übernachtskultur der Stämme 39072 und 3986, noch die Überstände oder die Zell-Lysate der infizierten Hep-2-Zellkulturen führten im Lymphozytentransformationstest (siehe 4.13) zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle signifikanten Erhöhung der Lymphozytenproliferation. Eine Mitogenität war somit nicht nachweisbar (nicht illustriert).

Eine deutliche proliferative Antwort durch Zugabe von PHA in der Positivkontrolle bestätigt jedoch die Zuverlässigkeit des LTT.

### **Rekombinante Expression in *E. coli***

Da SPEG<sup>dys</sup> in der Streptokokkenkultur zumindest *in vitro* weder im Immunoblot noch über die mitogene Aktivität nachgewiesen werden konnte, versuchten wir, das Protein in *E. coli* rekombinant zu exprimieren (siehe 4.10). Das Gen *speg<sup>dys</sup>* wurde dazu in verschiedene Expressionsplasmide der pQE-Reihe inseriert. In pQE 50 ohne His-Tag Fusion und in pQE 60 und pQE32 mit His-Tag Fusion. Während in den Zwischenklonen in *E. coli* Stämmen, die nicht zur Expression geeignet sind, die Sequenzen für *speg<sup>dys</sup>* intakt waren, gelang eine Expression nach Transformation in den Expressionstamm M15 (pRep4) nicht. Von zwei Parallelkulturen wurde zu einem Röhrchen IPTG zugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Dann wurden die Bakteriensedimente lysiert und nach Denaturierung des Proteingemisches in SDS-Probebuffer mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.11) sowie nach Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembran im Westernblot untersucht. Der Nachweis von SPEG<sup>dys</sup> auf den Blots gelang aber weder nach Inkubation mit Anti-SPEG<sup>GAS</sup> Antiserum (siehe 4.12) noch mit kommerziellen Anti-His-Tag Antikörpern, mit denen die His-Tag Fusion nachgewiesen werden kann.

Die Überprüfung durch Sequenzanalyse ergab, dass spätestens nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG das Gen *speg<sup>dys</sup>* Fehler und Deletionen in der Sequenz aufwies, die den Leserahmen zerstörten (nicht illustriert).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Protein SPEG<sup>dys</sup> schon in geringster Konzentration toxisch für *E. coli* Bakterien ist, so dass *E. coli* Zellen, die es exprimieren, sofort absterben. Nur Deletionsmutanten, in denen das Gen zerstört ist, überleben.

## 6. Diskussion

Ungefähr 5 - 8 Prozent aller Streptokokkeninfektionen des Menschen werden durch humanpathogene Gruppe-C- und G-Streptokokken (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) verursacht. Die hervorgerufenen Krankheitsbilder ähneln dabei denen von Infektionen mit GAS. In den letzten Jahren wurden GCS/GGS sogar bei verschiedenen Patienten (Keiser und Campbell, 1992; Wagner et al., 1996; Natoli et al., 1996) als Auslöser des Streptokokken bedingten Toxisch-Schock-Syndrom (STSS) gefunden.

Bislang sind mit der Streptokinase (Malke et al., 1985), der C5a-Peptidase (Cleary et al., 1991) und dem M-Protein (Geyer et al., 1999) einige Pathogenitätsfaktoren von GCS/GGS bekannt und näher untersucht worden. Erythrogene Toxine, auch als Superantigene bekannt, die bei A-Streptokokken vor allem für den toxischen Schock verantwortlich gemacht werden (Kotb, 1995; McCormick et al., 2001), konnten bei humanpathogenen C- und G-Streptokokken bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit für die GAS Superantigen-Gene *spea*, *spec*, *speg* und *spez* (*smez*) spezifischen Gensonden im Genom von verschiedenen GCS/GGS-Stämmen aus der Stammsammlung der FSU Jena nach homologen SAG-Genen zu suchen. Eine parallele Studie (S. Sachse) untersuchte GCS/GGS Stämme auf das Vorhandensein der GAS Superantigen-Gene *speh*, *spei*, *spej* und *ssa*.

Im Falle der bereits in den 80iger Jahren charakterisierten Toxine SPEA, SPEC und SPEZ/SMEZ blieben die Hybridisierungsversuche mit den entsprechenden für diese Proteine kodierenden Gensonden allerdings negativ. Das Funktionieren der Methode der Dot-Blot-Hybridisierung konnte durch die positiven Reaktionen der GAS-Kontroll-DNA aber bestätigt werden.

Damit decken sich unsere Ergebnisse mit denen einer vorangegangenen Studie von Roth et al. (1999), in der bei einem STSS auslösenden GGS-Stamm die Toxine SPEA und SPEC sowohl über einen ELISA Assay als auch durch PCR ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnten.

Zu gleichen Resultaten kamen auch Wagner et al. 1996. Bei einer Frau mit STSS wurde in der Blutkultur ein GGS-Stamm als Auslöser identifiziert, die Suche nach den Genen *spea*, *speb* und *spec* blieb jedoch mit der – auch von uns verwendeten – Southern Hybridisierung erfolglos, genauso wie die Suche nach den Toxin-Proteinen mit Immunoblots. Hierbei ist



allerdings nochmals darauf hinzuweisen, dass SPEB zwar vermutlich schwere Gewebszerstörungen auslösen kann, nach mehreren Untersuchungen (Gerlach et al., 1994; Fleischer, 1995) aber kein Superantigen darstellt (siehe auch 0), sondern eine hochwirksame Protease.

Die in der Arbeit von Wagner et al. (1996) auf Grund der immuntoxischen Wirkung geäußerte Vermutung, dass der von den Autoren isolierte GGS-Stamm ein unbekanntes Exotoxin produziert, wird durch unsere Ergebnisse bestärkt. Die Sonde *speG<sup>GAS</sup>* hybridisierte mit der DNA von 2 der 7 GCS- und 13 von 17 GGS-Stämme. Das heißt, in der von uns untersuchten Stichprobe besitzen knapp 30 % der GCS- und mehr als 75 % der GGS-Stämme in ihrer DNA Abschnitte, die dem Gen des erst 1999 von Proft et al. beschriebenen pyrogenen Exotoxin G (SPEG) gleich oder zumindest sehr ähnlich sind. Trotz der hier ermittelten unterschiedlichen Häufigkeit des Vorkommens des potentiellen Gens in den beiden Serogruppen ist anzumerken, dass eine statistische Signifikanz durch die relativ geringe Probenanzahl knapp verfehlt wird (exakter Fisher-Test,  $p = 0,06$ ; siehe auch 0).

Im Folgenden war die Frage zu klären, wie groß die durch die Hybridisierung der Sonde *speG<sup>GAS</sup>* dokumentierte Ähnlichkeit von bestimmten Genomabschnitten der GCS/GGS-Stämme mit dem Gen *speG* der A-Streptokokken (*speG<sup>GAS</sup>*) ist und inwieweit sich dahinter eventuell ein bisher bei GCS/GGS unbekanntes Gen verbirgt. Dazu führten wir mit den für die Amplifizierung des Gens *speG<sup>GAS</sup>* in GAS-DNA konstruierten Primern eine PCR durch, bei der die DNA ausgewählter GCS/GGS-Stämme als Template diente. Eine scharfe Bande auf Höhe der Molekülgröße des Gens *speG<sup>GAS</sup>* ergab ein weiteres Indiz für die Übereinstimmung eines Abschnitts der GCS/GGS-DNA mit dem Gen *speG<sup>GAS</sup>*.

In der Studie von S. Sachse zeigte sich, dass mit den Sonden für die Gene *spej* und *ssa* ebenfalls positive Hybridisierungen auf GCS- und GGS-DNA gelangen, nicht jedoch mit den Sonden *speH* und *speI*. Während wir mit den spezifischen Primern für *speG<sup>GAS</sup>* mit der DNA verschiedener GCS- und GGS-Stämme in der PCR homologe Amplifikate erhielten, ließen sich mit den entsprechenden GAS-Primern für *spej* oder *ssa* keine *spej*- oder *ssa*-spezifischen Amplifikate aus GCS/GGS-DNA herstellen (Sachse et al., 2002).

Der endgültige Beweis dafür, dass die untersuchte C- und G-Streptokokken-DNA *speG<sup>GAS</sup>*-ähnliche Teile aufweist, gelang mit der kompletten Sequenzierung des amplifizierten DNA-Fragmentes aus dem GGS-Stamm 39072. Der ermittelte offene Leserahmen umfasst wie der

von *speg*<sup>GAS</sup> 705 Bp und beide Sequenzen zeigen – trotz einiger Abweichungen vor allem im Mittelteil – insgesamt eine sehr hohe Übereinstimmung. Die neue Gensequenz wurde nach der taxonomischen Eingruppierung der humanpathogener GCS/GGS als *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* „*speg*<sup>dys</sup>“ benannt und unter diesem Namen mit der Zugriffsnummer AJ294849 in die internationale NCBI-Datenbank gestellt.

Der offene Leserahmen *speg*<sup>dys</sup> kodiert das Protein SPEG<sup>dys</sup>, das in seiner Aminosäurefolge dem Superantigen SPEG<sup>GAS</sup> zu 82 % entspricht und zusätzlich 5 % ähnlich ist. Damit ist die Homologie größer, als die der am nächsten miteinander verwandten Streptokokken-SAGs SPEJ und SPEC (Proft et al., 1999: 56 %). Diese sehr hohe Übereinstimmung lässt darauf schließen, dass SPEG<sup>dys</sup> – wie bereits für SPEG<sup>GAS</sup> beschrieben – superantigene Eigenschaften besitzen kann.

Damit ist nicht nur ein neues Gen im Genom von GCS/GGS identifiziert worden, wir konnten das erste Mal überhaupt die genetische Information zur potentiellen Expression eines Superantigens bei humanpathogenen GCS/GGS nachweisen. Die Streptokokkenstämme, in denen Artiushin et al. (2002) *speh*- und *spei*-ähnliche und Proft et al. (2003) *spel*- und *spem*-ähnliche SAG-Gene fanden, zählen zwar auch zur Serogruppe C, gehören aber taxonomisch zur Spezies *S. equi*, die hauptsächlich pathogen für Pferde ist.

Die Möglichkeit der Expression von Superantigenen stellt für humanpathogene GCS/GGS einen völlig neuen, hochpotenten Pathogenitätsfaktor dar. Superantigene führen bereits in geringsten Mengen zu massiver T-Zellaktivierung und rufen damit im menschlichen Organismus lokale Komplikationen, z. T. aber auch generalisierte Störungen mit Multi-Organ-Versagen und toxischem Schock hervor (siehe 2.4).

Um das von den GCS/GGS kodierte Superantigen näher charakterisieren zu können, führten wir verschiedene Versuche zur Expression von SPEG<sup>dys</sup> durch. Für die rekombinante Expression wurde *speg*<sup>dys</sup> zunächst erfolgreich zwischenkloniert. Die Umklonierung in verschiedene Expressionsvektoren und die Transformation in die *E. coli*-Expressionsstämme bereitete aber bereits Probleme. Nur wenige Klone enthielten noch das korrekte Gen. Durch Zugabe von IPTG sollten diese Klone dann zur Expression von SPEG<sup>dys</sup> angeregt werden. Aber weder durch das fusionierte His-Tag, noch mit spezifischen Anti-SPEG<sup>GAS</sup> Antikörpern konnten wir SPEG<sup>dys</sup> nachweisen. Es besteht die Möglichkeit, dass bei dem Anti-SPEG<sup>GAS</sup>-Antiserum, das durch Immunisierung von Kaninchen mit SPEG<sup>GAS</sup> gewonnen wurde, auf

Grund der doch vorhandenen Sequenzunterschiede die Konzentration kreuzreaktiver Antikörper zu gering ist, um Spuren einer Expression nachzuweisen. Wahrscheinlicher aber ist, dass gar kein SPEG<sup>dys</sup> exprimiert wurde, denn Nachsequenzierungen der Expressionsklone ergaben, dass schon bei normaler Stammhaltung, spätestens aber nach Zugabe von IPTG Deletionen oder gar der komplette Verlust des Gens *speg<sup>dys</sup>* auftraten. Es ist anzunehmen, dass SPEG<sup>dys</sup> für die verwendeten *E. coli* Expressionsstämme derart toxisch ist, dass sie, um zu überleben, mutierten und das kodierende Gen inaktivierten oder eliminierten.

Leider konnten wir so die Erfolge der Arbeitsgruppe um Proft (Proft et al., 1999) bei der rekombinanten Expression von SPEG<sup>GAS</sup> nicht auf SPEG<sup>dys</sup> übertragen. In Fortsetzung dieser Arbeit wird allerdings an der FSU Jena im Labor von Dr. Schmidt weiter an der rekombinanten Expression von SPEG<sup>dys</sup> gearbeitet und mit einem *E. coli* zellfreien *in vitro* Expressionssystem gibt es erste positive Ergebnisse.

Parallel zur rekombinanten Expression von SPEG<sup>dys</sup> in *E. coli* führten wir Versuche zur Expression des Proteins in den Streptokokkenkulturen durch. Aber auch hier war kein Nachweis von SPEG<sup>dys</sup> möglich.

Noch sensibler als der immunchemische Nachweis ist – bei entsprechender mitogener Aktivität einer Substanz – der Lyphozytentransformationstest (LTT). Wir untersuchten mit diesem Verfahren die Kulturüberstände der GGS-Stämme 39072 und 39086, konnten dabei aber keine erhöhte Proliferation der Lymphozyten feststellen. Das gelang aber auch Roth et al. (1999) nicht, obwohl der analysierte G-Streptokokken-Stamm von einer Patientin stammte, deren Krankheitsbild eindeutig die Kriterien für ein Streptokokken bedingtes Toxisch-Schock-Syndrom der amerikanischen „Working Group on Severe Streptococcal Infections“ (1993) erfüllt.

Die Frage, ob eine Expression von SPEG<sup>dys</sup> eventuell in Anwesenheit von menschlichen Zellen stattfindet, überprüften wir an einer Kultur von mit Streptokokken des Stammes 39072 (GGS) infizierten menschlichen Hep-2-Zellen. Aber auch hier ließ sich weder durch Antikörperreaktion noch im LTT SPEG<sup>dys</sup> aufzeigen.

Somit ist es uns nicht gelungen, das von dem neu entdeckten Gen *speg<sup>dys</sup>* der GCS/GGS kodierte Protein SPEG<sup>dys</sup> *in vitro* nachzuweisen. Auf Grund der weiten Verbreitung humanpathogener GAS und GCS/GGS und dem, verglichen damit, relativ seltenen Auftreten besonderer Komplikationen und STSS ist aber davon auszugehen, dass selbst *in vivo* eine

Expression von Superantigenen wie SPEG nur unter besonderen Bedingungen stattfindet. Auch aus GAS gelang der direkte Nachweis einer Expression von SPEG<sup>GAS</sup> nicht (Proft, persönliche Information). Dessen mitogene Eigenschaften wurden mit rekombinanten SPEG<sup>GAS</sup> untersucht (Proft et al., 1999). Im menschlichen Organismus selber ist der Nachweis von SAGs wegen der extrem geringen Mengen nahezu unmöglich. Deswegen ist die Erkenntnis über die genetische Ausstattung eines Mikroorganismus ein wichtiges Kriterium zur Einschätzung seiner Pathogenität.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals bei humanpathogenen C- und G-Streptokokken ein Gen gefunden und sequenziert werden, das ein potientes Superantigen (SPEG<sup>dys</sup>) kodiert. Es existiert ein offener Leserahmen, der in der Translation ein Protein ergibt, das dem seit kurzem bekannten SAG SPEG<sup>GAS</sup> der Gruppe-A-Streptokokken sehr ähnlich ist. Mit unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass wahrscheinlich verschiedene humanpathogene GCS/GGS-Stämme zur Produktion von Superantigen(en) fähig sind

Damit wäre ein neuer, hochpotenter Pathogenitätsfaktor gefunden, der – im Gegensatz zu den bereits bekannten – auch den dramatischen Verlauf mancher *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Infektionen und das Auslösen des STSS durch diese Serogruppen gut erklären kann.

Im Ergebnis vorliegender Arbeit wird die oft noch unterschätzte Bedeutung der C- und G-Streptokokken als humanpathogene Erreger untermauert. Deswegen sollte auch weiterhin *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* neben *S. pyogenes* im Blickpunkt der Streptokokkenforschung stehen.

## 7. Schlussfolgerungen

Anliegen dieser Arbeit war es, im Genom von C- und G-Streptokokkenstämmen nach Superantigen kodierenden Genen zu suchen. Dieses Ziel wurde erreicht, denn durch erfolgreiche Dot-Blot-Hybridisierung konnten wir zeigen, dass verschiedene GCS/GGS-Stämme DNA-Abschnitte enthalten, die dem 1999 von Proft et al. bei A-Streptokokken beschriebenen Gen *speg<sup>GAS</sup>*, welches das Superantigen SPEG<sup>GAS</sup> kodiert, entsprechen oder ihm stark ähneln.

Die Ergebnisse des Screenings wurden durch PCR und Sequenzierung bestätigt und präzisiert. Mit *speg<sup>dys</sup>* konnten wir erstmals bei GCS/GGS ein Gen identifizieren, das ein potentielles Superantigen kodiert. Der offene Leserahmen von *speg<sup>dys</sup>* ergibt in der Translation das Protein SPEG<sup>dys</sup>, das in seiner Aminosäuresequenz der des Superantigens SPEG<sup>GAS</sup> zu 82 Prozent gleicht und zusätzlich zu 5 Prozent ähnlich ist. Beide Proteine sind 234 Aminosäuren lang.

Die von uns ermittelte DNA-Sequenz von *speg<sup>dys</sup>* bildete die Grundlage für die Studie von S. Sachse zur Sequenzanalyse der flankierenden genomischen Regionen in verschiedenen GGS-Stämmen. In einer gemeinsamen Publikation (Sachse S; Seidel P. et al. 2002) wurden die Ergebnisse dieser Studie und der vorliegenden Arbeit veröffentlicht.

Auch wenn bis jetzt eine Expression von SPEG<sup>dys</sup> zur Funktionsanalyse nicht gelungen ist, kann man auf Grund der Ähnlichkeit der beiden Proteine davon ausgehen, dass auch SPEG<sup>dys</sup> im menschlichen Organismus als Superantigen wirken kann. Einen Hinweis auf die hohe Toxizität von SPEG<sup>dys</sup> gab es bei den Expressionsversuchen in *E. coli*. Die Bakterien deletierten sofort nach Translation das Gen *speg<sup>dys</sup>* oder führten durch Zerstörung des Leserahmens zur Verhinderung der Expression.

Dass wir bisher *in vitro* bisher keine Expression und auch keine biologischen Wirkungen von SPEG<sup>dys</sup> nachweisen konnten heißt nicht, dass nicht *in vivo* unter bestimmten Umständen doch eine Expression möglich ist (Roth et al., 1999). Da Superantigene die Hauptverantwortung für das Auftreten des Streptokokken bedingten Toxisch-Schock-Syndroms (STSS) tragen und in letzter Zeit vermehrt derartige Komplikationen bei GCS/GGS-Infektionen beschrieben wurden, ist das ein indirekter Hinweis auf die Produktion von Superantigenen bei GCS/GGS. Die Identifizierung von *speg<sup>dys</sup>*/SPEG<sup>dys</sup> kann diese bisher nur vermutete Kausalität untermauern. SPEG<sup>dys</sup> könnte der erste Vertreter einer bei

Streptokokken außerhalb der Serogruppe A bislang nicht nachgewiesene Klasse von Pathogenitätsfaktoren – der Superantigene – sein.

Superantigene sind hochpotente mikrobielle Toxine, die in geringsten Konzentrationen zu einer verstärkten Ausschüttung von Interferonen und Zytokinen führen. Wegen der extrem geringen Mengen ist der Nachweis im menschlichen Organismus nahezu unmöglich. Zur Überprüfung der biologischen Wirkungen könnten Infektionsversuche mit GCS- und GGS-Stämmen unter *in vivo* Bedingungen im Tiermodell (Maus oder Kaninchen) durchgeführt werden. Vorversuche, in denen wir Hep-2-Kulturen mit GGS infizierten, gaben keinen Hinweis auf eine Expression von SPEG<sup>dys</sup>.

Eine rekombinante Expression bleibt deshalb unerlässlich. Eventuell lässt sie sich in eukariotischen Systemen z. B. in Hefen oder Insektenzellen realisieren. Eine andere Möglichkeit wären noch zellfreie Systeme zur *in vitro* Translation. Neue Versuche im Labor Dr. Schmidt in diese Richtung zeigen auch erste positive Ergebnisse.

Wie das Screening mit DNA-Sonden zeigt, ist das Gen *speg*<sup>dys</sup> bei den von uns untersuchten Stämmen relativ häufig. 2 von 7 der GCS- und 13 von 17 der GGS-Stämme tragen es. Das häufigere Vorkommen bei GGS fällt auf, ist aber statistisch auf Grund der geringen Probenzahl nicht zu beweisen. Dafür sind weitere Untersuchungen nötig. Auch ob es von *speg*<sup>dys</sup> in den verschiedenen Serogruppen unterschiedliche Allele gibt, ist noch abzuklären.

Neuentdeckungen von Superantigenen bei GAS wie SPEL und SPEM 2002 von Smoot et al. und die, wie in dieser Arbeit mit SPEG<sup>dys</sup> erstmals für GCS/GGS, mögliche Identifizierung auch in anderen Serogruppen, sowie Theorien zur Beteiligung von Superantigenen an vielen anderen Krankheiten (siehe 2.4) unterstreichen die Bedeutung dieser Toxine, die in Zukunft sicher noch wachsen wird.

Auch im Ergebnis der vorliegenden Arbeit müssen die C- und G-Streptokokken weiter in den Blickpunkt als humanpathogene Erreger rücken. Streptokokkenforschung darf sich nicht auf *S. pyogenes* beschränken, denn auch andere Serogruppen besitzen, wie wir zeigen konnten, ähnliche Virulenzgene und dürfen deswegen in ihrer Pathogenität nicht unterschätzt werden.

## 8. Literaturverzeichnis

**Acha-Orbea H, MacDonald HR.**

Superantigens of mouse mammary tumor virus.  
Annu Rev Immunol 1995;13:459-86

**Artiushin SC, Timoney JF, Sheoran AS, Muthupalani SK.**

Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*.  
Microb Pathog 2002 Feb;32(2):71-85

**Atkin CL, Wei S, Cole BC.**

The *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM: purification and identification of an active peptide.  
Infect Immun 1994 Dec;62(12):5367-75

**Balaban N, Rasooly A.**

Staphylococcal enterotoxins.  
Int J Food Microbiol 2000 Oct 1;61(1):1-10

**Barson WJ.**

Group C streptococcal osteomyelitis.  
J Pediatr Orthop 1986 May-Jun;6(3):346-8

**Ben Nasr A, Wistedt A, Ringdahl U, Sjobring U.**

Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins.  
Eur J Biochem 1994 Jun 1;222(2):267-76

**Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit A.**

Mechanism of membrane damage by streptolysin-O.  
Infect Immun 1985 Jan;47(1):52-60

**Bisno AL, Collins CM, Turner JC.**

M proteins of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis.  
J Clin Microbiol 1996 Oct;34(10):2511-5

**Blackwell CC, Saadi AT, Raza MW, Weir DM, Busuttil A.**

The potential role of bacterial toxins in sudden infant death syndrome (SIDS).  
Int J Legal Med 1993;105(6):333-8

**Bradley SF, Gordon JJ, Baumgartner DD, Marasco WA, Kauffman CA.**

Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases.  
Rev Infect Dis 1991 Mar-Apr;13(2):270-80

**Carmeli Y, Ruoff KL.**

Report of cases of and taxonomic considerations for large-colony-forming Lancefield group C streptococcal bacteremia.

J Clin Microbiol 1995 Aug;33(8):2114-7

**Chen CC, Cleary PP.**

Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*.

J Biol Chem 1990 Feb 25;265(6):3161-7

**Cleary PP, Peterson J, Chen C, Nelson C.**

Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci.

Infect Immun 1991 Jul;59(7):2305-10

**Collins CM, Kimura A, Bisno AL.**

Group G streptococcal M protein exhibits structural features analogous to those of class I M protein of group A streptococci.

Infect Immun 1992 Sep;60(9):3689-96

**Dale JB, Beachey EH.**

Multiple, heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins.

J Exp Med 1985 Jan 1;161(1):113-22

**Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels MR.**

Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci.

Infect Immun 1996 May;64(5):1495-501

**Dobrescu D, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN.**

Enhanced HIV-1 replication in V beta 12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen.

Cell 1995 Sep 8;82(5):753-63

**Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najjar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R.**

Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.

Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Apr 10;98(8):4658-63

**Fleischer B, Gerlach D, Fuhrmann A, Schmidt KH.**

Superantigens and pseudosuperantigens of gram-positive cocci.

Med Microbiol Immunol (Berl) 1995 May;184(1):1-8

**Fox K, Turner J, Fox A.**

Role of beta-hemolytic group C streptococci in pharyngitis: incidence and biochemical characteristics of *Streptococcus equisimilis* and *Streptococcus anginosus* in patients and healthy controls.

J Clin Microbiol 1993 Apr;31(4):804-7



**Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T**  
Superantigens - powerful modifiers of the immune system  
Mol Med Today 2000 Mar;6(3):125-32

**Fuller AT.**  
The formamide method for the extraction of polysaccharides from hemolytic streptococci.  
Brit J Exp Pathol 1938;19:130-9

**Gaunt N, Rogers K, Seal D, Denham M, Lewis J.**  
Necrotising fasciitis due to group C and G haemolytic streptococcus after chiropody.  
Lancet 1984 Mar 3;1(8375):516

**Gaunt PN, Seal DV.**  
Group G streptococcal infection of joints and joint prostheses.  
J Infect 1986 Sep;13(2):115-23

**Gerlach D, Knoll H, Kohler W, Ozegowski JH, Hribalova V.**  
Isolation and characterization of erythrogenic toxins. V. Communication: identity of erythrogenic toxin type B and streptococcal proteinase precursor.  
Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [A] 1983 Sep;255(2-3):221-33

**Gerlach D, Reichardt W, Fleischer B, Schmidt KH.**  
Separation of mitogenic and pyrogenic activities from so-called erythrogenic toxin type B (Streptococcal proteinase).  
Zentralbl Bakteriolog 1994 Mar;280(4):507-14

**Geyer A, Roth A, Vettermann S, Gunther E, Groh A, Straube E, Schmidt K.**  
FEMS Immunol Med Microbiol 1999 Oct;26(1):11-24  
M protein of a Streptococcus dysgalactiae human wound isolate shows multiple binding to different plasma proteins and shares epitopes with keratin and human cartilage.

**Geyer A, Schmidt KH.**  
Genetic organisation of the M protein region in human isolates of group C and G streptococci: two types of multigene regulator-like (mgrC) regions.  
Mol Gen Genet 2000 Jan;262(6):965-76

**Gnann JW Jr, Gray BM, Griffin FM Jr, Dismukes WE.**  
Acute glomerulonephritis following group G streptococcal infection.  
J Infect Dis 1987 Aug;156(2):411-2

**Günther E.**  
Diagnostik (Typisierung) von Streptokokken.  
Nova Acta Leopoldina NF 73 1996;296:77-83

**Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ.**  
Multiple adhesins of streptococci.  
Infect Immun 1992 Jun;60(6):2147-52

**Henderson CA, Hight AS.**

Acute psoriasis associated with Lancefield Group C and Group G cutaneous streptococcal infections.

Br J Dermatol 1988 Apr;118(4):559-61

**Hirose Y, Yagi K, Honda H, Shibuya H, Okazaki E.**

Toxic shock-like syndrome caused by non-group A beta-hemolytic streptococci.

Arch Intern Med 1997 Sep 8;157(16):1891-4

**Huang TT, Malke H, Ferretti JJ.**

The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis.

Mol Microbiol 1989 Feb;3(2):197-205

**Ito Y, Abe J, Yoshino K, Takeda T, Kohsaka T.**

Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein.

J Immunol 1995 Jun 1;154(11):5896-906

**Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM.**

Medizinische Mikrobiologie: Verstehen – Lernen – Nachschlagen

9., überarb. und neugest. Aufl. – Stuttgart; New York: Thieme 1997

**Keiser P, Campbell W.**

'Toxic strep syndrome' associated with group C *Streptococcus*.

Arch Intern Med 1992 Apr;152(4):882, 884

**Klein J.**

Immunologie.

1. Aufl. – Weinheim; New York; Basel; Cambridge: VCH, 1991

**Köhler W, Prokop O, Kühnemund O.**

Routine identification of group-C streptococci by means of an agglutinin (protectin) from the albumen gland of the edible snail, *Helix pomatia*.

J Med Microbiol 1973 Feb;6(1):127-30

**Köhler W.**

A-Streptokokken: Wandel in der Virulenz?

Die gelben Hefte 1995;35:20-9

**Kotb M.**

Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens.

Clin Microbiol Rev 1995 Jul;8(3):411-26

**Kyhse-Andersen J.**

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J Biochem Biophys Methods 1984 Dec;10(3-4):203-9

**Laemmli UK.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 1970 Aug 15;227(259):680-5

**Lancefield RC.**

A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.  
J Exp Med 1933;57:571-95

**Lawrence J, Yajko DM, Hadley WK.**

Incidence and characterization of beta-hemolytic *Streptococcus milleri* and differentiation from *S. pyogenes* (group A), *S. equisimilis* (group C), and large-colony group G streptococci.  
J Clin Microbiol 1985 Nov;22(5):772-7

**Malke H, Roe B, Ferretti JJ.**

Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A.  
Gene 1985;34(2-3):357-62

**Marrack P, Kappler J.**

The staphylococcal enterotoxins and their relatives.  
Science 1990 May 11;248(4956):705-11

**McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM.**

Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.  
Annu Rev Microbiol 2001;55:77-104

**Mohr DN, Feist DJ, Washington JA 2nd, Hermans PE.**

Infections due to group C streptococci in man.  
Am J Med 1979 Mar;66(3):450-6

**Monday SR, Vath GM, Ferens WA, Deobald C, Rago JV, Gahr PJ, Monie DD, Iandolo JJ, Chapes SK, Davis WC, Ohlendorf DH, Schlievert PM, Bohach GA.**

Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins.  
J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4550-9.

**Muller S, Kohler H.**

B cell superantigens in HIV-1 infection.  
Int Rev Immunol 1997;14(4):339-49

**Natoli S, Fimiani C, Faglieri N, Laurenzi L, Calamaro A, Frasca AM, Arcuri E.**

Toxic shock syndrome due to group C streptococci. A case report.  
Intensive Care Med 1996 Sep;22(9):985-9

**Norrby-Teglund A, Thulin P, Gan BS, Kotb M, McGeer A, Andersson J, Low DE.**

Evidence for superantigen involvement in severe group A streptococcal tissue infections.  
J Infect Dis 2001 Oct 1;184(7):853-60

**Paliard X, West SG, Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL.**

Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis.  
Science 1991 Jul 19;253(5017):325-9

**Podbielski A, Zarges I, Flosdorff A, Weber-Heynemann J.**

Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (sdaD).

Infect Immun 1996 Dec;64(12):5349-56

**Proft T, Moffatt SL, Berkahn CJ, Fraser JD.**

Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*.

J Exp Med 1999 Jan 4;189(1):89-102

**Proft T, Webb PD, Handley V, Fraser JD.**

Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*.

Infect Immun 2003 Mar;71(3):1361-9

**Rakonjac JV, Robbins JC, Fischetti VA.**

DNA sequence of the serum opacity factor of group A streptococci: identification of a fibronectin-binding repeat domain.

Infect Immun 1995 Feb;63(2):622-31

**Rantz LA, Randall E.**

Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping.

Stanford Med Bull 1955;13:290-1

**Reda KB, Kapur V, Mollick JA, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR.**

Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (ssa) from *Streptococcus pyogenes*.

Infect Immun 1994 May;62(5):1867-74

**Reichardt W, Muller-Alouf H, Alouf JE, Kohler W.**

Erythrogenic toxins A, B and C: occurrence of the genes and exotoxin formation from clinical *Streptococcus pyogenes* strains associated with streptococcal toxic shock-like syndrome.

FEMS Microbiol Lett 1992 Dec 15;79(1-3):313-22

**Roth S, Andrassy K, Schmidt KH, Gunther E, Ritz E**

Febrile lady with acute renal failure and desquamating erythema.

Am J Kidney Dis 1999 Jul;34(1):150-4

**Sachse S, Seidel P, Gerlach D, Günther E, Rödel J, Straube E, Schmidt KH.**

Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, subsp *equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG(dys)).

FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Oct 11;34(2):159-67.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A 1977 Dec;74(12):5463-7

**Schlievert PM, Gocke JE, Deringer JR.**

Group B streptococcal toxic shock-like syndrome: report of a case and purification of an associated pyrogenic toxin.

Clin Infect Dis 1993 Jul;17(1):26-31

**Schlievert PM.**

Searching for superantigens. Immunological and molecular diagnosis of infectious disease. Amsterdam, Cunningham, van OSS. Marcel Dekker New York 1997

**Schmidt KH**

Die Bindung von Plasmaproteinen an Streptokokken: Biochemische, immunochemische und biologische Untersuchungen zur Bindung von Fibrinogen, Albumin, Immunglobulin G und Fibronectin.

Habilitationsschrift. Eingereicht an der Akademie der Wissenschaften der DDR.

**Schmidt KH, Gerlach D, Wollweber L, Reichardt W, Mann K, Ozegowski JH, Fleischer B.**

Mitogenicity of M5 protein extracted from *Streptococcus pyogenes* cells is due to streptococcal pyrogenic exotoxin C and mitogenic factor MF.

Infect Immun 1995 Dec;63(12):4569-75

**Schmidt KH, Günther E, Courtney HS.**

Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos.

Med Microbiol Immunol (Berl) 1996 Feb;184(4):169-73

**Schnitzler N, Podbielski A, Baumgarten G, Mignon M, Kaufhold A.**

M or M-like protein gene polymorphisms in human group G streptococci.

J Clin Microbiol 1995 Feb;33(2):356-63

**Schwartz RH, Knerr RJ, Hermansen K, Wientzen RL.**

Acute epiglottitis caused by beta-hemolytic group C Streptococci.

Am J Dis Child 1982 Jun;136(6):558-9

**Sepkowitz KA, Kasemsri T, Brown AE, Kiehn TE, Armstrong D.**

Meningitis due to beta-hemolytic non-A, non-D streptococci among adults at a cancer hospital: report of four cases and review.

Clin Infect Dis 1992 Jan;14(1):92-7

**Smirnov OYu, Denesyuk AI, Zakharov MV, Abramov VM, Zav'yalov VP.**

Protein V, a novel type-II IgG receptor from *Streptococcus* sp.: sequence, homologies and putative Fc-binding site.

Gene 1992 Oct 12;120(1):27-32

**Smith H.**

The revival of interest in mechanism of bacterial pathogenicity.

Biol Rev 1995;70:277-319

**Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy, L.G. and Musser, J.M.**

Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks.

Proc Nat Acad Sci 2002; 69:4668-4673

**Stevens DL.**

Invasive group A streptococcus infections.  
Clin Infect Dis 1992 Jan;14(1):2-11

**Stryker WS, Fraser DW, Facklam RR.**

Foodborne outbreak of group G streptococcal pharyngitis.  
Am J Epidemiol 1982 Sep;116(3):533-40

**Sumida T, Yonaha F, Maeda T, Tanabe E, Koike T, Tomioka H, Yoshida S.**

T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjogren's syndrome patients.  
J Clin Invest 1992 Feb;89(2):681-5

**Sutkowski N, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT.**

An Epstein-Barr virus-associated superantigen.  
J Exp Med 1996 Sep 1;184(3):971-80

**Tai JY, Kortt AA, Liu TY, Elliott SD.**

Primary structure of streptococcal proteinase. III. Isolation of cyanogen bromide peptides: complete covalent structure of the polypeptide chain.  
J Biol Chem 1976 Apr 10;251(7):1955-9

**Ting JP, Baldwin AS.**

Regulation of MHC gene expression.  
Curr Opin Immunol 1993 Feb;5(1):8-16

**Todd EW.**

A study of the inhibition of streptococcal protease by sera of normal and immune animals and of patients infected with group A hemolytic streptococci.  
J Exp Med 1947;85:591-606

**Tomai M, Kotb M, Majumdar G, Beachey EH.**

Superantigenicity of streptococcal M protein.  
J Exp Med 1990 Jul 1;172(1):359-62

**Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA.**

Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov.  
Int J Syst Bacteriol 1996 Jul;46(3):774-81

**Venezio FR, Gullberg RM, Westenfelder GO, Phair JP, Cook FV.**

Group G streptococcal endocarditis and bacteremia.  
Am J Med 1986 Jul;81(1):29-34

**Wagner JG, Schlievert PM, Assimacopoulos AP, Stoehr JA, Carson PJ, Komadina K**

Acute group G streptococcal myositis associated with streptococcal toxic shock syndrome: case report and review.  
Clin Infect Dis 1996 Nov;23(5):1159-61

**Weber GF, Cantor H.**

HIV glycoprotein as a superantigen. A mechanism of autoimmunity and implications for a vaccination strategy.

Med Hypotheses 1993 Sep;41(3):247-50

**Working Group on Severe Streptococcal Infections.**

Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. Rationale and consensus definition.

JAMA 1993 Jan 20;269(3):390-1

**Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA.**

T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions.

J Exp Med 1992 Apr 1;175(4):993-1002

**Yarwood JM, Leung DY, Schlievert PM.**

Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome.

FEMS Microbiol Lett 2000 Nov 1;192(1):1-7

**Young L, Deighton CM, Chuck AJ, Galloway A.**

Reactive arthritis and group G streptococcal pharyngitis.

Ann Rheum Dis 1992 Nov;51(11):1268

## **Publikationen mit Ergebnissen dieser Arbeit**

**Sachse, S., Seidel, P., Gerlach, D., Günther, E., Rödel, J., Straube, E., Schmidt, K.H. (2002)**

Superantigen like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, subsp. *equisimilis*: Genomic localization of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (*speG<sup>dys</sup>*).

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 34:159-167

## **Vorträge und Poster:**

**Schmidt, K.-H., Seidel, P., Sachse, S., Gerlach, D., Günther, E., Rödel, J., Straube, E. (2001)**

Superantigen like gene(s) in human pathogenic group C and G streptococci. Abstract. 53. Tagung der DGHM, 30.09. bis 02.10. 2001 in Aachen.

IJMM 291, Supplement 32, P42

**Schmidt, K.-H., Sachse, S., Seidel, P., Günther, E., Rödel, J., Straube, E., Gerlach, D. (2002)**

Superantigen like gene(s) in human pathogenic group C and group G streptococci. 54. DGHM Tagung, October 2002 in Heidelberg.

IJMM 292, Supplem. 34, MPP51

**Schmidt, K.-H., Sachse, S., Seidel, P., Günther, E., Rödel, J., Straube, E., Gerlach, D. (2002)**

Screening for superantigen like gene(s) in human pathogenic group C and G streptococci. XV. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases.

October 2002, Goa, India



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. E. Straube vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. rer. nat. habil. K.-H. Schmidt für die interessante Themenstellung und seine stete Unterstützung und Anregung.

Für die Bereitstellung des Anti-SPEG-Kaninchenserums danke ich Herrn Dr. sc. nat. D. Gerlach und für die Betreuung des LTT Herrn Dr. rer. nat. J. Rödel.

Ein Dank richtet sich auch an Frau R. John für die hilfreichen Hinweise und Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Abschließend noch ein Dank an alle Anderen, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, an Astrid und Dirk, an Katharina und an Doris.

## **Lebenslauf**

Name: Seidel, Peter

Geburtsdatum: 24.03.1971

Geburtsort: Arnstadt

09/1977 - 08/1987 Schule der DSF Arnstadt

09/1987 - 08/1989 Abitur EOS Arnstadt

09/1989 - 04/1990 Wehrdienst

05/1990 - 08/1990 Zivildienst

09/1990 - 09/1991 arbeitslos

10/1991 - 06/1997 Studium Zahnmedizin FSU Jena

06/1997 Staatsexamen

11/1997 - 07/1998 Assistenz Zahnarzt Praxis Dres. Wustelt in Jena

seit 10/1998 Assistenz Zahnarzt Praxis Dr. Brauer in Weimar

Jena,

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. habil. K.-H. Schmidt, D. Weidenhammer,
- ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena,