# Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Manuel Heintz**

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 2006

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn
1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2006

**(D 386)**

# I. Inhaltsverzeichnis


| | Kapitel | Seitenzahl |
|---|---|---|
| **I.** | **Inhaltsverzeichnis** | 1 |
| **II.** | **Zusammenfassung** | 4 |
| **III.** | **Abkürzungsverzeichnis** | 6 |
| **1.** | **Einleitung** | 7 |
| 1.1 | *Streptococcus pneumoniae* | 8 |
| 1.2 | Signaltransduzierende Zwei-Komponenten-Systeme | 10 |
| 1.3 | Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* | 15 |
| 1.4 | Penicillin-Bindeproteine und Resistenz gegen β-Laktam-Antibiotika | 19 |
| 1.5 | Kompetenz von *S. pneumoniae* | 21 |
| 1.6 | Zielsetzung dieser Arbeit | 24 |
| **2.** | **Material und Methoden** | 25 |
| 2.1 | Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits | 25 |
| 2.2 | Bakterienstämme | 27 |
| 2.3 | Oligonukleotide | 28 |
| 2.4 | Nährmedien | 32 |
| 2.4.1 | CpH8 (C-Medium) | 32 |
| 2.4.2 | Todd-Hewitt-Broth (THB) | 33 |
| 2.4.3 | Blutagar | 33 |
| 2.5 | Mikrobiologische Methoden | 34 |
| 2.5.1 | Stammkonservierung | 34 |
| 2.5.2 | Anzuchtbedingungen | 34 |
| 2.5.3 | Mikroskopische Analyse von Zellen | 35 |
| 2.5.4 | Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) | 35 |
| 2.6 | Transformation von *Streptococcus pneumoniae* | 36 |
| 2.7 | Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren | 37 |
| 2.7.1 | Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* | 37 |
| 2.7.2 | Präzipitation von DNA | 38 |
| 2.7.3 | Phenolextraktion | 38 |
| 2.7.4 | DNA-Elution aus Agarosegelen | 39 |
| 2.7.5 | Aufreinigung von PCR-Produkten | 39 |
| 2.7.6 | Quantifizierung von DNA | 39 |
| 2.7.7 | Präparation von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae* | 40 |
| 2.7.8 | Reinigung der RNA | 41 |
| 2.7.9 | Qualitätsüberprüfung der RNA | 41 |
| 2.7.10 | Quantifizierung der RNA | 41 |
| 2.8 | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) | 42 |
| 2.8.1 | Direkte PCR aus Flüssig-/Glycerinkultur | 44 |
| 2.8.2 | RT-PCR | 44 |
| 2.9 | Elektrophorese von Nukleinsäuren | 45 |
| 2.10 | Sequenzierung von DNA | 47 |
| 2.11 | Auftrennung und Markierung von Penicillin-Bindeproteinen | 48 |
| 2.12 | Inaktivierung von Genen durch Integration einer Resistenzkassette | 49 |
| 2.13 | Globale Transkriptionsanalysen mit der Mikroarray-Technik | 51 |
| 2.14 | Das *Streptococcus pneumoniae* R6 Oligo-Set | 51 |

| | Kapitel | Seitenzahl |
|---|---|---|
| 2.15 | Herstellung der Biochips | 51 |
| 2.16 | Markierung der Hybridisierungsprobe | 53 |
| 2.16.1 | Markierung von RNA | 53 |
| 2.16.2 | Markierung von genomischer DNA | 54 |
| 2.16.3 | Qualitätskontrolle der Markierungsreaktion | 55 |
| 2.17 | Hybridisierung | 56 |
| 2.17.1 | Manuelle Hybridisierung | 56 |
| 2.17.2 | Maschinelle Hybridisierung | 57 |
| 2.17.3 | Hybridisierung mit random Cy3-Nonameren | 58 |
| 2.18 | Einscannen und Erfassen der Bilddaten | 59 |
| 2.19 | Analyse der Bilddaten | 59 |
| 2.20 | Computergestützte Datenverarbeitung und –analyse | 62 |
| **3.** | **Ergebnisse** | 63 |
| | **A. Phänotypische Charakterisierungen des Cia-Systems** | 63 |
| 3.1 | Das Cia-System schützt vor Zellwandstress | 64 |
| 3.2 | Das Cia-System in Kombination mit PBP-Proteinen | 68 |
| 3.3 | Aktivierung des Cia-Systems durch PBP2x-Mutationen | 72 |
| 3.4 | Mögliche Schlüsselenzyme für Cia-verwandte Phänotypen | 74 |
| 3.5 | Identifizierung von Vernetzungen des Cia-Systems mit anderen Signaltransduktionswegen | 82 |
| | **B. Globale Transkriptionsanalysen** | 88 |
| 3.6 | Etablierung der Mikroarray-Technik | 89 |
| 3.6.1 | Validierung des *Streptococcus pneumoniae* R6 Oligo-Sets | 89 |
| 3.6.2 | Herstellung der Biochips | 95 |
| 3.6.3 | Herstellung der Hybridisierungssonde | 97 |
| 3.6.4 | Hybridisierung | 98 |
| 3.6.5 | Datenaquisition und Datenanalyse | 99 |
| 3.7 | Globale Transkriptionsanalysen zur Untersuchung des Cia-Regulons | 104 |
| 3.7.1 | Das Cia-Regulon im Wildtyp R6 | 105 |
| 3.7.2 | Cia-abhängig transkribierte Gene in der CiaR-Deletionsmutante | 111 |
| 3.7.3 | Effekte der CiaH-Deletion auf die Transkription von Genen | 124 |
| 3.8 | Globale Transkriptionsanalyse von Cefotaxim-spontanresistenten Labormutanten | 126 |
| 3.9 | Transkriptionsvergleich der spontanresistenten Labormutanten C503 und C606 | 130 |
| 3.10 | Das Cia-System und Vancomycinbehandlung | 135 |
| **4.** | **Diskussion** | 137 |
| 4.1 | Das Cia-System und PBP-Mutationen | 138 |
| 4.1.1 | Die Notwendigkeit eines funktionellen Cia-Systems in Anwesenheit von PBP-Mutationen | 138 |
| 4.1.2 | Die Aktivierung des Cia-Systems durch PBP-Mutationen | 139 |
| 4.1.3 | Das Cia-System schützt vor Zelllyse und vermittelt Resistenz gegen Zellwandinhibitoren | 141 |
| 4.1.4 | Das Cia-System und Kompetenz | 143 |
| 4.1.5 | Das Cia-System und Virulenz | 144 |

| | Kapitel | Seitenzahl |
|---|---|---|
| 4.2 | Identifizierung von Cia-regulierten Genen | 145 |
| 4.3 | Die Vernetzung des Cia-Systems mit anderen Signaltransduktionswegen in *S. pneumoniae* | 149 |
| 4.4 | Das Cia-System – eine Zusammenfassung | 151 |
| 4.5 | Ausblick | 152 |
| **5.** | **Literaturverzeichnis** | 153 |
| **6.** | **Anhang** | 171 |

*Danksagung*
*Lebenslauf*

# II. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-System CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Zwei-Komponenten-Systeme sind an der Adaptation der Bakterien an Umweltbedingungen entscheidend beteiligt. Sie bestehen in der Regel aus einer Histidinkinase (hier CiaH) und einem Responseregulator (hier CiaR). Die Histidinkinase dient der Signaldetektion und Aktivierung des Responseregulators, welcher die zelluläre Antwort vermittelt.
Das Cia-System wurde als Resistenzdeterminante in spontanresistenten Labormutanten gegen Cefotaxim identifiziert. Weiterhin hat dieses Zwei-Komponenten-System Einfluss auf die Zelllyse, die Virulenz und ist an der Regulation der genetischen Kompetenz beteiligt. Es wird für die Lebensfähigkeit von Zellen mit PBP2x-Punktmutationen benötigt.
Inhaltlicher Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war neben der Etablierung der Mikroarray-Technik und globalen Transkriptionsanalysen die funktionelle Charakterisierung des Cia-Systems mit phänotypischen Analysen.
Die Etablierung der Mikroarray-Technik befasste sich mit allen Schritten des Mikroarray-Prozesses inklusive Biochip-Herstellung, Datenauswertung und der Validierung des Oligo-Sets. Nach erfolgreicher Etablierung wurde diese Technik benutzt, um Cia-regulierte Gene zu identifizieren. Durch Vergleich des Transkriptoms von verschiedenen Cia-Mutanten mit dem Wildtyp R6 wurden insgesamt 158 Gene unterschiedlich transkribiert. Davon gehörten 73 Gene zum minimalen Cia- und zum Kompetenz-Regulon, welche schon als Cia-reguliert bekannt waren (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Überraschenderweise wurden weitere 85 Gene Cia-abhängig transkribiert, deren Genprodukte funktionell in Zucker- und Stickstoffmetabolismus sowie Transport gruppiert werden konnten. Wahrscheinlich wurden die meisten dieser 85 Gene indirekt als Folge der veränderten Zuckerverwertung reguliert.
Ähnliche funktionelle Gengruppen konnten in den globalen Transkriptionsanalysen der spontanresistenten Laborfamilie C103 bis C503 aufgestellt werden. In dieser Mutantenfamilie sind Mutationen in CiaH, PBP2x und PBP2a gefunden worden. Besonders auffällig war bei diesen Untersuchungen die kontinuierliche Verstärkung der Transkription der Gene des minimalen Cia-Regulons von C103 bis C503. Deshalb ist von einer Aktivierung des Cia-Systems durch PBP-Mutationen auszugehen. Diese Aktivierung konnte auch in RT-PCR-Versuchen am Beispiel einzelner Gene des minimalen Cia-Regulons bestätigt werden.
Da das Cia-System durch PBP-Mutationen aktiviert wird und ein funktionelles Cia-System bei Anwesenheit von bestimmten PBP2x-Mutationen benötigt wird, wurde in dieser Arbeit diese Notwendigkeit des Cia-Systems auch bei anderen PBP-Mutationen durch phänotypische Analysen überprüft. Dabei wurde durch Inaktivierung des Cia-Systems in verschiedenen Stämmen festgestellt, dass nicht nur Zellen mit einzelnen, im Labor selektierten PBP2x-Mutationen, sondern auch ohne ein PBP2a- und ohne ein PBP1a-Protein auf ein Cia-System angewiesen sind. Klinische PBP2x-Allele benötigten ebenfalls – aber in geringeren Maßen – das Cia-System. Wahrscheinlich haben in diesen kompensatorische Mutationen durch Evolution in der freien Natur stattgefunden. Damit wurde auch zum ersten Mal gezeigt, dass PBP-Mutationen nicht neutral sind und verschiedene PBP-Mutationen unterschiedliche Auswirkungen haben.
Weiterhin wurde untersucht, welche Gene tatsächlich die durch das Cia-System verursachten Phänotypen auslösen. Dazu wurden 6 Cia-regulierte Genregionen bzw. Einzelgene mit einer Erythromycin-Resistenzkassette inaktiviert und auf das Vorhandensein von Cia „OFF"-phänotypischem Verhalten analysiert. Kein Gen konnte für das Resistenz- oder das Lyseverhalten ausfindig gemacht werden. Hingegen waren die Proteine HtrA und Spr0782 an der Reprimierung der Kompetenz durch das Cia-System beteiligt. Bei beiden Proteinen

konnte nur eine Reprimierung in CpH8- und nicht in THB-Medium nachgewiesen werden, so dass eventuell noch von weiteren Faktoren ausgegangen werden muss.
Die hier vorgelegten Ergebnisse haben die bisher vorliegenden Daten über das Cia-System bestätigt und entscheidende Einblicke nicht nur in die mögliche Funktion, sondern vor allem in das komplexe vernetzte Regulationssystem gegeben. Diese stellen eine wichtige Grundlage für weitere Experimente dar.

# III. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| *ad* | auf |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Asp | Aspartat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPasen | Adenosintriphosphatase |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin) |
| C | Cytosin |
| CBP | Cholin-Bindeprotein |
| cDNA | Copy DNA |
| Cef | Cefotaxim |
| CFU | Colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten, KBE) |
| cm | Zentimeter |
| CSP | competence stimulating peptide |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleotidtriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DOC | Desoxycholat |
| DTE | Dithioerythrol |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythmidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ERG | Eppendorf-Reagenzgefäß |
| et al. | *et alii* (und andere) |
| FDR | False Discovery Rate |
| for | forward (vorwärts) |
| FWER | Family Wise Error Rate |
| G | Guanin |
| g | SI Erdbeschleunigung (981 cm $s^{-2}$) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| $H_20_{dest.}$ | $H_20$ destilliert |
| $HCl_{konz.}$ | Konzentrierte Salzsäure |
| HEPES | (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| His | Histidin |
| HK | Histidinkinase |
| Hmw-PBP | High molecular wheight PBP |
| Hypoth. | Hypothetisch |
| kb | Kilobasen |
| KD | Kinasedomäne |
| kDa | Kilodalton |
| Lmw-PBP | Low molecular wheight PBP |
| Log | Logarithmisch |
| LOWESS | Locally Weighted Scatter Plot Smoothing |
| M | 1 Molar |
| MAP-Kinasen | Mitogen-aktivierte Proteinkinasen |
| MHK | Minimale Hemm-Konzentration |
| min | Minute |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mol | Molar |
| N | Beliebige Base |
| N (Zahl) | Nephelo (Zahl) |
| NaAc | Natriumacetat |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| P | Phosphat |
| p. A. | pro analysi |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBP | Penicillin-Bindeprotein |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction) |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| pmol | Picomolar |
| PMT | Photo-Multiplier-Tube |
| PTS | Phosphoenolpyruvat-Transferase System |
| RBS | Ribosomenbindestelle |
| rev | Reverse (rückwärts) |
| RH | Relative Humidity (Relative Feuchte) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Rotation per minute (Rotationen pro Minute) |
| RR | Responseregulator |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| s | Sekunde |
| SD | Sensordomäne |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sp. | Species |
| SPDB | Solid Phase DNA Binding |
| sRNA | Small RNA |
| SSB | Single strand DNA Binding protein |
| SSC-Puffer | „Sodium sodium-citrate“-Puffer |
| ssDNA | Einzelsträngige DNA |
| STABW | Standardabweichung |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TCS | Zwei-Komponenten-System (two-component system) |
| TE | Tris-EDTA |
| TEE | Tris-Essigsäure-EDTA |
| TEMED | N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin |
| THB | Todd-Hewitt-Broth |
| Tm | Schmelztemperatur |
| tRNA | Transfer-RNA |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UMP | Uridinmonophosphat |
| V | Volt |

# 1. Einleitung

Jedes Lebewesen befindet sich in ständigem Austausch mit seiner Umwelt. Es benötigt chemische Substanzen für den katabolen und anabolen Metabolismus sowie Informationen über die Beschaffenheit seiner Umgebung. Im Gegenzug werden Moleküle an die Umwelt als metabole Endprodukte und als Informations- und Aggressionsprodukte für bzw. gegen andere Lebewesen ausgeschieden. Bei Bakterien kommt diesem Austausch eine besondere Bedeutung zu, da diese das höchste natürlich vorkommende Oberflächen-Volumen-Verhältnis haben. Zusätzlich sind sie meistens nicht in einen geordneten Zellverbund eingebettet, so dass eine Zelle alle für sie notwendigen Funktionen selbst erfüllen muss. Für die Übermittlung von Umweltinformationen an die Bakterienzelle sind verschiedene Prinzipien entwickelt worden. Zum einen kann ein Transfer der Information direkt in eine Adaption der Zelle umgewandelt werden, z.B. durch Bindung eines Signalmoleküls an einen Transkriptionsfaktor. Zum anderen kann Information indirekt über Intermediatoren übermittelt werden, z.B. durch Zwei-Komponenten-Systeme. Diese können die Anwesenheit eines äußeren Signals in einen Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteine umwandeln. Ob die Information direkt oder indirekt übertragen wird, ist auch abhängig von der Natur der Substanz, die die Information transportiert. Die Antwort auf Informationen in der Zelle ist in ein komplexes regulatorisches Netzwerk eingebunden, um ein lebenserhaltendes Gleichgewicht von allen benötigten Funktionen zu gewährleisten.
Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der zellulären Antwort einer indirekten Informationsübermittlung durch ein Zwei-Komponenten-System. In der Einleitung wird zunächst der untersuchte Organismus *Streptococcus pneumoniae* vorgestellt. Anschließend wird das Prinzip signaltransduzierender Zwei-Komponenten-Systeme sowie im speziellen das Zwei-Komponenten-System CiaRH näher erläutert. Mutationen in dem CiaH-Protein können Auswirkungen auf die β-Laktam-Empfindlichkeit und die Kompetenz haben. Daher wurden Kapitel über Penicillin-Bindeproteine sowie die Kompetenz bei *S. pneumoniae* in die Einleitung aufgenommen.

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

**Morphologie**
Die Streptokokken sind eine heterogene Gattung grampositiver, kugel- oder eiförmiger, unbeweglicher Bakterien, die zu Paaren oder Ketten unterschiedlicher Länge vereinigt sind (*streptos* = gewunden, verdrillt). Die Einzelzellen weisen einen Durchmesser von 0,5 – 1,5 µm auf. Die Nährstoffanforderungen der Streptokokken sind sehr komplex. Sie benötigen eine Kohlenstoffquelle, Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine und einige Vitamine. *Streptococcus pneumoniae* bildet aufgrund der Kapsel auf Festmedium eine schleimige, selten größer als 1 mm große Kolonie. Die Kolonien enthalten eine zentrale Vertiefung aufgrund des autolytischen Verhaltens in der stationären Phase (Lüttiken, 1988; Patterson, 1991). Diese Autolyse wird hauptsächlich durch das LytA-Enzym, eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase, verursacht (Höltje und Tomasz, 1976; Garcia *et al.*, 1986).

**Systematik**
Die Streptokokken gehören in die Familie der *Lactococcaceae*, den Milchsäurebakterien. Sie betreiben eine homofermentative Milchsäuregärung, bei der Laktat als Hauptendprodukt entsteht. Die Streptokokken zeichnen sich durch die Abwesenheit von Katalase und einen niedrigen GC-Gehalt aus, weshalb sie in den Clostridium-Zweig eingeordnet werden. Dieser ist dem Actinomyceten-Zweig mit hohem GC-Gehalt gegenübergestellt (Schleifer und Ludwig, 1995). Serologisch werden die Streptokokken in Lancefield-Gruppen von A – Z bzw. ohne Gruppe unterteilt (Lancefield, 1933). Die Lancefield-Gruppierung klassifiziert die Antigenität eines in der Zellwand lokalisierten Antigens. Dieses ist ein polymeres Kohlenhydrat, welches die Kapsel darstellt. Diese Lancefield-Gruppen werden weiter in Serovare unterteilt. Es können bisher über 90 verschiedene Pneumokokken-Serovare anhand unterschiedlicher Kapselpolysaccharide differenziert werden. Eine weitere Möglichkeit, die heterogene Gruppe der Streptokokken zu unterteilen, stellt die Klassifikation nach der Hämolyse auf Blutagarplatten dar (Brown, 1919). Als β-Hämolyse werden große, gelbliche Hämolysehöfe um Kolonien auf Blutagarplatten bezeichnet. α-Hämolyse ist ein durch Wasserstoffperoxid getriebener Prozess, bei dem sich eine grüne Zone um die Kolonien bildet. Diese entsteht durch Reduktion des Hämoglobins zu Methämoglobin oder einer Biliveridin-ähnlichen Verbindung durch $H_2O_2$. Die Erythrozytenmembranen bleiben dabei weitgehend intakt. Zu diesen „vergrünenden“ Streptokokken gehören *S. pneumoniae* sowie *S. mitis* und *S. oralis*. Mit dem verwirrenden Begriff der γ-Hämolyse bezeichnet man die Abwesenheit makroskopisch sichtbarer Hämolysezonen (z.B. Stämme von *S. bovis* und *S. salivarius*). *S. pneumoniae* kann unter anaeroben Bedingungen aber auch eine β-Hämolyse aufgrund des sauerstofflabilen Hämolysins durchführen (Clark, 1986; Tuomanen, 2000). *S. pneumoniae* kann von anderen Streptokokken durch die hämolytische Reaktion, die Lancefield-Gruppierung sowie durch biochemische Reaktionen (höhere Empfindlichkeit gegen Optochin (Ethylhydrocuprein) und Gallensalze) unterschieden werden.

**Historie**
Im Jahre 1881 wurde zum ersten Mal ein Bakterium der Gattung *Streptococcus* wissenschaftlich genannt. Sternberg und Pasteur isolierten und beschrieben *Streptococcus pneumoniae* als *Streptokokkus lanceolatum* fast gleichzeitig. Innerhalb weniger Jahre nach dieser ersten Entdeckung wurde der Zusammenhang zwischen dem, auch unter dem Namen *Diplokokkus pneumoniae* geführten, Bakterium und einer Vielzahl von Krankheiten, z.B. Lungen-, Mittelohr-, Nebenhöhlen- und Hirnhautentzündung, entdeckt. Seitdem gilt dieses Bakterium als eines der am meisten untersuchten Bakterien. Frederick Griffith publizierte 1928 an *Streptococcus pneumoniae* den ersten Beweis der Transformierbarkeit von Bakterien. Er konnte nicht Kapsel-bildende Mutanten durch Zugabe einer Suspension Hitze-abgetöteter

Pneumokokken verschiedener Kapseltypen in Kapsel-bildende Mutanten überführen. Oswald T. Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty konnten schließlich 1944 die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information der Lebewesen identifizieren. Sie vermengten gereinigte DNA von Kapsel-bildenden Mutanten mit nicht Kapsel-bildenden Mutanten und konnten die nicht pathogenen kapsellosen Mutanten so in pathogene kapselhaltige Mutanten überführen (Avery *et al.*, 1944).

**Pathogenität**

*S. pneumoniae* kolonisiert seinen menschlichen Wirt in der Mikroflora der Schleimhäute des Hals-, Nasen- und Rachenraumes. Die Erstbesiedlung erfolgt überwiegend innerhalb der ersten Lebensstunden, aber z.T. auch in jedem anderen Alter (Austrian, 2000). Bei 20 – 40% der Bevölkerung wird der obere Respirationstrakt, ohne Krankheiten zu verursachen, besiedelt (Gosink und Tuomanen, 2000). Infektionen gehen in der Regel von der eigenen Flora aus (endogene Infekte), wobei prädisponierende Faktoren wie kardiopulmonale Grundleiden und vorausgegangene Infekte eine bedeutende Rolle spielen. Aber trotz der geringen Anzahl an Infektionen im Vergleich zur Besiedlungsdichte, trotz vorhandener Impfstoffe und der Therapierbarkeit durch Antibiotika sterben weltweit drei bis fünf Millionen Menschen jedes Jahr an Infektionen durch Pneumokokken (Tomasz, 1997).
Innerhalb der Streptokokken gibt es für den Menschen kommensale Bakterien, die zur Normalflora der Schleimhäute besonders im oralen und rachialen Bereich gehören (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. intermedius* und weitere). Diese können bei Menschen mit noch nicht voll ausgebildetem oder geschwächtem Immunsystem zu opportunistischen Krankheitserregern werden (Patterson, 1991) und Endokarditis oder eitrige Abzesse (*S. milleri* – Gruppe) sowie Karies (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*) verursachen. Weiterhin gibt es innerhalb der Streptokokken-Gattung hoch infektiöse Bakterien. Hierzu zählt *S. pyogenes*, welcher Tonsillopharyngitis (Gaumenmandelentzündung), lokale Hautinfekte sowie je nach Immunitätslage Scharlach oder schwere Infekte herbeiführen kann. Weiter gelten *S. agalactiae*, welcher Meningitis und Sepsis bei Neugeborenen auslösen kann, und *S. pneumoniae*, welcher Infekte der Atemwege, Sepsis und Meningitis verursachen kann, als gefährliche Infektionserreger.
Die Arbeit von Griffith (1928) ist zugleich auch der erste Beweis für die Ausbildung der natürlichen Kompetenz bei *S. pneumoniae* (siehe Kapitel 1.5). Dass ein Zusammenhang zwischen Kompetenz und Virulenz besteht, ist seit dem Ausschalten von essentiellen Komptenzgenen bekannt (Bartilson *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Hava *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Guiral *et al.* (2005) formulierten die Hypothese der Allolyse. Bei dieser wird der nicht–kompetente Teil einer Population durch die kompetenten Zellen lysiert. Diese Lyse resultiert in der Freisetzung von Virulenzfaktoren wie dem intrazellulären zytolytischen Toxin (Hämolysin) Pneumolysin von nicht-kompetenten Zellen (Gilmore und Haas, 2005).
Die Kapsel gilt als wichtigster Virulenzfaktor, da diese die Aufnahme und Verdauung durch Makrophagen erschwert (Muscher *et al.*, 2000). Weitere Virulenzfaktoren sind das Pneumolysin (ein β-Hämolysin), die IgA1-Protease, CbpA (ein Zelloberflächenadhäsin), das PspA (Inhibitior des Komplementsystems), sowie die Neuraminidase und die Hyaluronidase (Mitchell *et al.*, 1997).

## 1.2 Signaltransduzierende Zwei-Komponenten-Systeme

Mit Hilfe von signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-Systemen (TCS, two-component system; TCSTS, two-component signal transducing system) können Zellen adäquat auf Umweltreize reagieren und sich verändernden Umweltbedingungen anpassen. TCS kommen sowohl in Prokaryoten, in denen sie zuerst entdeckt wurden (Nixon *et al.*, 1986), als auch in niederen Eukaryoten z.B. *Saccharomyces cerevisae* vor (Loomis *et al.*, 1997/1998; Brown und Firtel, 1998). TCS sind in der Regel nicht essentiell und an vielen zellulären Prozessen beteiligt, weshalb sie als ubiquitäres Regulationsinstrument verstanden werden. So finden sich TCS z.B. zur Sporulation, Osmoregulation, Photosynthese, Chemotaxis, Kompetenz und zum Phosphatmetabolismus (Grebe und Stock, 1999). In Eukaryoten finden sich TCS oft am Anfang von Signalkaskaden, die mit konventionellen eukaryotischen Signalwegen wie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und zyklischen Nukleotidkinasen interagieren. Bis jetzt wurden noch keine TCS in Tieren nachgewiesen. Weder im menschlichen Genom, noch in dem von *Drosophila melanogaster*, noch in dem von *Caenorabditis elegans* finden sich TCS (West und Stock, 2001).
Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) sind als potentielle Ziele für antimikrobielle Substanzen in den letzten Jahren aufgekommen, da sie in Bakterien weit verbreitet sind und nicht in Säugetieren vorkommen. Obwohl TCS in den meisten Fällen nicht essentiell sind, sind sie als Ziel attraktiv, da sie auch zur kontrollierten Expression von Virulenzgenen benutzt werden (Stephenson und Hoch, 2002 a-c). Weiterhin wurden TCS gefunden, die zur Kontrolle von Resistenzgenen benutzt wurden (Evers und Courvalin, 1996; Novak *et al.*, 1999; Rasmussen und Kovacs, 1993).

**Genereller Aufbau**
Der generelle Aufbau eines Zwei-Komponenten-Systems ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Zwei-Komponenten-Systeme bestehen aus einer Histidinkinase (HK) und einem Responseregulator (RR). Jedes dieser Proteine besteht aus zwei Domänen unterschiedlicher Funktionalität. Die Histidinkinase ist oft, aber nicht notwendigerweise, ein Transmembranprotein und für die Erkennung des externen Signals verantwortlich. Die HK hat eine Autophosphorylierungsaktivität.
Der Responseregulator übernimmt das Phosphat von der HK und kann, durch die damit verbundene Aktivierung der DNA-bindenden Domäne, eine zelluläre Antwort hervorrufen. Es gibt Variationen dieses einfachen Zwei-Schritt-Schemas, bei denen mehrere Histidinkinasen denselben RR phosphorylieren (z.B. bei der Chemotaxis in *Bacillus subtilis*) oder zwei Histidinkinasen zwei Responseregulatoren regulieren. Noch komplexere Varianten von Phosphatübertragungssystemen, bei denen mehrere Proteine den Phosphatfluss beeinflussen können, stellen sogenannte „Phosphorelay"-Systeme dar. Hier sind mehrere (mindestens zwei) Phosphattransferreaktionen in einen Reaktionsweg integriert. Diese Systeme finden sich vermehrt in Eukaroyten.

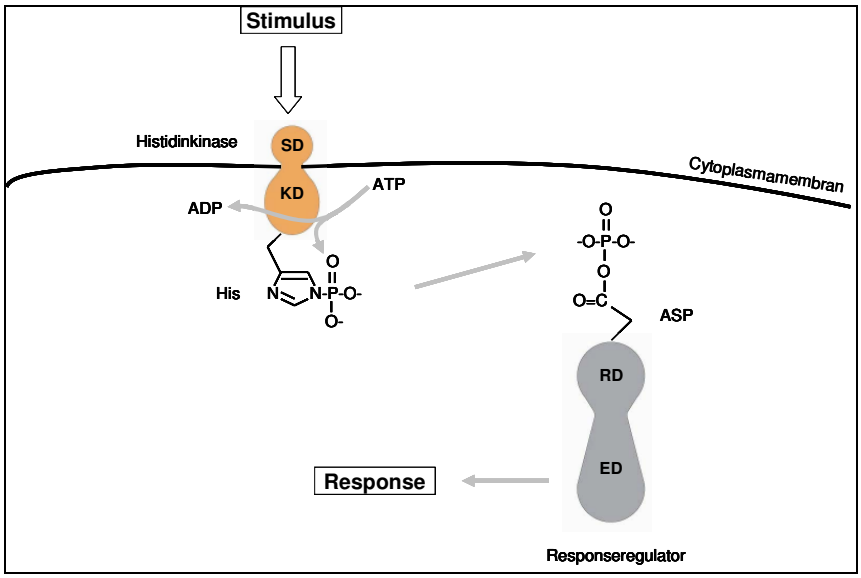



**Abb. 1.1: Genereller Aufbau eines Zwei-Komponenten-Systems**
Dargestellt ist das Zusammenspiel zwischen dem Prototyp einer Membran-gebundenen Histidinkinase und einem Responseregulator. Das Phosphat aus dem ATP wird zuerst an das Histidin, dann an das Aspartat gekoppelt. ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, SD = Sensordomäne, KD = Kinasedomäne, RD = regulatorische Domäne, ED = Effektordomäne.

## Histidinkinasen

Histidinkinasen, deren Superfamilie schon 1999 mehr als 350 Mitglieder enthielt (Grebe und Stock, 1999), bestehen in der einfachen Version aus zwei Domänen: einer diversen N-terminalen Input- oder Sensordomäne (SD) und einer konservierten C-terminalen Kinasedomäne (KD). Die Gesamtaktivität der Kinase wird durch die Anwesenheit des Eingangssignals moduliert. Die ATP-abhängige Autophosphorylierung ist eine bimolekulare Reaktion zwischen zwei Homodimeren, bei der ein HK-Monomer die Phosphorylierung am konservierten Histidinrest des zweiten HK-Monomers katalysiert (*trans*-Reaktion). Der Phosphatrest wird dann stöchiometrisch auf einen konservierten Aspartatrest in der regulatorischen Domäne eines RR übertragen.
Die Autophosphorylierung der HK am konservierten Histidin führt zu Phosphoamidaten bzw. Phosphoimidazolen. Die Hydrolyse von Phosphoamidaten hat eine größere negative freie Energie als z.B. Phosphoester. Die Stickstoff-Phosphat-Bindung (siehe Abb. 1.1) ist hoch energetisch und ideal für Phosphorylübertragungen, weshalb sie auch in anderen Proteinen, wie z.B. Succinyl-CoA-Synthetase und Pyruvatphosphatdikinase, vorkommt (Wolodko *et al.*, 1994; Spronk *et al.*, 1976). Die Phosphorylierung des Histidins kann entweder am N1 oder am N3 des Imidazolrings erfolgen. Beide Formen konnten auch in Proteinen aufgezeigt werden, allerdings konnte in den bisher charakterisierten Histidinkinasen nur N3-Phospho-Histidin nachgewiesen werden (Surette *et al.*, 1996; Amemura *et al.*, 1990). Nur ein kleiner Teil der HK-Population liegt in der phosphorylierten Form vor, da das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis weit unter eins vorliegt. Somit ist der Fluss an Phosphorylgruppen entscheidender als die stöchiometrische Phosphorylierung der HK.
Die Dimerisierungseinheit der HK wird z.T. auch als eigenständige Domäne angesehen (West und Stock, 2001), in Analogie zu dem CheA-Protein von *B. subtilis*, für das die Eigenständigkeit dieser Einheit gezeigt werden konnte (Bilwes *et al.*, 1999). Neben der Vorwärts-Phosphorylierungsreaktion besitzen viele Histidinkinasen eine Phosphataseaktivität, mit der sie ihre kognaten Responseregulatoren dephosphorylieren können. Diese bifunktionellen Histidinkinasen sind überwiegend an Phosphattransferreaktionen beteiligt, deren übermittelte zelluläre Antwort möglichst schnell abgeschaltet werden soll (Stock *et al.*, 2000).

Histidinkinasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: orthodoxe Kinasen und Hybridkinasen (Parkinson und Kofoid, 1992; Alex *et al.*, 1994). Die einfacheren orthodoxen Kinasen, z.B. das *E. coli* EnvZ Protein, sind überwiegend Transmembranrezeptoren mit zwei Transmembranregionen, die das Protein in eine periplasmatische N-terminale SD und eine cytoplasmatische C-terminale KD teilen (siehe Abb. 1.1). Es gibt aber auch HK mit mehr als zwei Transmembransegmenten, z.B. FixL aus *Rhizobium meliloti* und UhpB aus *E. coli*, welche vier bzw. acht Transmembransegmente haben. Weiterhin sind nicht alle orthodoxen Kinasen Transmembranrezeptoren. Die Chemotaxiskinase CheA und die Stickstoff-regulatorische Kinase NtrB sind cytoplasmatische Kinasen, die durch intrazelluläre Stimuli oder durch Interaktionen mit cytoplasmatischen Domänen von anderen Proteinen reguliert werden können. Die Hybridkinasen sind überwiegend in Eukaryoten, aber auch z.T. in Prokaryoten zu finden. Diese Proteine enthalten mehrere Phosphodonor- und Phosphoakzeptorstellen, die in Multischritt-Phosphorelay-Schematas eingesetzt werden. Die Komplexität von Hybridkinasen erlaubt die Einbeziehung unterschiedlicher Regulationen und Signale in einen Signalweg.

**Struktur der Histidinkinasen**

Die wichtigste Strukturdomäne der HK-Familie ist die Kinasedomäne, welche aus einer Dimerisierungdomäne und einer ATP/ADP-Bindungs-Phosphotransfer (= katalytischen) Domäne besteht (Stock, 1999). Die KD ist ca. 350 Aminosäuren lang und verantwortlich für ATP-Bindung und die Transphosphorylierung. Innerhalb der KD konnten fünf konservierte Aminosäuremotive identifiziert werden: H-, N-, D-, F- und G-Boxen (Stock *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoid, 1992). In den meisten HK ist die H-Box, welche das konservierte Histidin enthält, Teil der Dimerisierungsdomäne. Die N-, D-, F- und G-Box sind gewöhnlich aufeinanderfolgend, wobei der Abstand zwischen diesen Motiven variieren kann, und bilden die ATP-Bindedomäne. Aufgrund von Sequenzvergleichen lassen sich die Histidinkinasen in 11 Unterfamilien einteilen: $HPK_1$ – $HPK_{11}$ (Grebe und Stock, 1999). Hierbei sind die $HPK_1$ bis $HPK_4$ die Unterfamilien mit den meisten Mitgliedern. Die $HPK_9$ stellt Chemotaxis-Kinasen dar, in $HPK_{10}$ sind Kompetenz-Kinasen enthalten und $HPK_{11}$ besteht aus Kinasen aus Methanobakterien. Diese drei Untergruppen zeigen eine sehr unterschiedliche Sequenzcharakteristik zu allen anderen Untergruppen.

Die Struktur der katalytischen Domäne der HK ist verschieden zu allen bisher bekannten Ser/Thr/Tyr-Kinasen, was einen unterschiedlichen Reaktionsmechanismus der HK nahe legt (Robinson und Stock, 1999). Der Hauptteil dieser Domäne besteht aus einem α/β-Sandwich aus fünf antiparallelen β-Strängen und 3 α-Helices. Diese Struktur findet sich ebenso in der Gyrase B, dem Hitzeschock-Protein HSP 90 und dem MutL Protein wieder, weshalb diese Proteinfamilie auch GHKL (Gly-His-Lys-Leu)-Superfamilie genannt wird (Dutta und Inouye, 2000; Stock, 1999). Die Dimerisierungsdomäne wird aus einem antiparallelen vier-Helix Bündel aufgebaut. Die Linkerdomäne, die die Sensordomäne mit der Kinasedomäne durch die Membran verbindet, besteht aus einer Transmembranhelix und einem cytoplasmatischen Linker. Diese Linkerregionen sind für eine richtige Signaltransduktion wichtig (Fassler *et al.*, 1997, Jourlin *et al.*, 1996). Computeranalysen sagen für diese Region ein 50 Aminosäuren-langes, α-helikales coiled coil-ähnliches Motiv voraus, welches in den meisten Fällen direkt die H-Box erreicht (Singh *et al.,* 1998). Die Spezifität der HK zu ihren kognaten RR wird durch hypervariable Aminosäurereste um das konservierte Histidin vermittelt (Zapf *et al.*, 2000).

**Responseregulatoren**

Die Responseregulatoren sind die terminalen Komponenten des Signalweges und fungieren als Phosphorylierungs-aktivierte Schalter (Switches) um adaptive Antworten hervorzurufen. Die RR katalysieren den Phosphoryltransfer von Phospho-Histidin der HK auf einen konservierten Aspartatrest in der eigenen regulatorischen Domäne. Kleine Moleküle, wie z.B. Acetylphosphat, Carbamoylphosphat, Imidazolphosphat und Phosphoramidat können ebenso als Phosphodonatoren dienen (Lukat *et al.,* 1992), allerdings mit einer sehr viel geringeren Effizienz (Zapf *et al.,* 1996; Mayover *et al.,* 1999). Dies zeigt, dass RR auch unabhängig von HK den Phosphoryltransfer katalysieren können. Viele RR haben auch eine Autodephosphorylierungsaktivität, welche die Halbwertszeit des aktivierten Zustandes der RR limitiert. Die meisten RR bestehen aus zwei Domänen: einer konservierten N-terminalen regulatorischen Domäne (RD) und einer variablen C-terminalen Effektordomäne (ED) (siehe Abb. 1.1). Die Mehrheit der RR sind Transkriptionsfaktoren mit DNA-Bindeeffektordomänen, die in Dimeren ihre Funktion ausüben. Einige RR haben C-terminale Domänen mit Enzymaktivität.

Die hoch-energetischen Acyl-Phosphate, die bei der Phosphorylierung an Aspartatresten entstehen, wurden auch z.B. für die Acetat-Kinase und P-Typ-ATPasen beschrieben (Anthony und Spector, 1972; Ridder *et al.*, 1999). Die freie Energie der Hydrolyse von Phospho-Aspartat ist sehr unterschiedlich im Gegensatz zu Acylphosphat (Hurley *et al.*, 1990), weshalb dieser eine große Bedeutung bei der Konformationsänderung des RR zugedacht wird (Jencks, 1980; Tanford, 1984). Die Halbwertszeiten variieren von Phospho-Aspartaten in RR sehr stark, mit Werten von Sekunden bis zu mehreren Stunden (Wright *et al.*, 1993; Weiss und Magasanik, 1988).

**Struktur der Responseregulatoren**

Die regulatorische Domäne der RR, die auch in Hybridkinasen oder als isolierte Proteine in Phosphorelay-Systemen gefunden werden kann, besteht aus einer zweifach gewundenen α/β-Einheit mit einem zentralen fünf-strängigen parallelen β-Faltblatt, welches von fünf α-Helices umgeben ist (Stock *et al.,* 1989; Volz und Matsumura*,* 1991). Der konservierte Aspartatrest liegt in der Nähe zu anderen sauren Aminosäureresten, die ebenso besonders oft durch Aspartatreste gebildet werden. Sie ergeben zusammen mit dem konservierten Aspartat ein acidisches Cluster. Dieses Cluster ist in der Koordination des $Mg^{2+}$-Ions beteiligt, welches für den Phosphoryltransfer und die Dephosphorylierung notwendig ist. Der Mechanismus für den Phosphoryltransfer ist vermutlich durch einen bipyramidalen pentavalenten Phosphat-Übergangszustand gekennzeichnet (Stock *et al.*, 1993; Herschlag und Jencks, 1990). Die Effektordomäne der RR kann aufgrund ihrer großen Diversität – selbst innerhalb einer Unterfamilie – nicht genau beschrieben werden. Die Mehrheit der Effektordomänen besitzt DNA-Bindeaktivität nach Dimerisierung. OmpR, als gut untersuchtes Beispiel der größten RR-Unterfamilie, definiert eine neue Unterklasse an winged-Helix Transkriptionsfaktoren (Martinez-Hackert und Stock, 1997). Auch bei der Aktivierung der RR durch Phosphorylierung ergibt sich kein einheitliches Bild. Die Phosphorylierung der regulatorischen Domäne verschiebt das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Form in den meisten Fällen zu Gunsten der aktiven Form, wie an OmpR gezeigt (Aiba *et al.*, 1989; Delgado *et al.*, 1993; Head *et al.*, 1998). Jeder Aktivierungsmechanismus basiert auf unterschiedlichen Interaktionen, die spezifisch für die unphosphorylierte oder phosphorylierte regulatorische Domäne sind. Die Aktivierung kann in Folge der Aufhebung der Inhibierung durch die regulatorische Domäne erfolgen oder die phosphorylierte Domäne hat selbst eine aktive Rolle in der weiteren Antwort. Die Phosphorylierung kann Dimerisierung, Oligomerisierung, Interaktionen mit anderen Proteinen oder mit DNA unterstützen. Die Phosphorylierung muss aber nicht notwendigerweise mit Aktivierung einhergehen (Posas und Saito, 1998).

**Regulation von Zwei-Komponenten-Systemen**

Die Regulation von TCS kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen, wobei die wichtigste das externe Signal für die HK darstellt. So kann durch die Signalerkennung die Kinaseaktivität (Borkovich und Simon, 1990) oder aber auch die Phosphataseaktivität der HK aktiviert werden (Atkinson *et al.*, 1994; Perego und Hoch, 1996). Zusätzlich können weitere Hilfsproteine diese Aktivitäten beeinflussen, z.B. wird die Phosphataseaktivität des NtrB Proteins durch das Hilfsprotein $P_{II}$ reguliert, dessen Fähigkeit mit NtrB zu interagieren von seinem Uridylierungsstatus abhängig ist. Diese Modifizierung, katalysiert durch das Enzym Uridyltransferase, ist wiederum durch die Konzentration an intrazellulärem 2-Ketoglutarat und Glutamin reguliert (Kamberov *et al.*, 1994). Ein weiterer Angriffspunkt der Regulation stellt die Phosphataseaktivität der RR dar. Auch hier können Hilfsproteine den Phosphorylierungsstatus der RR beeinflussen. So finden sich bei der Sporulation von *B. subtilis* andere Phosphatasen, die Spo0F dephosphorylieren können (Perego *et al.*, 1994). Weiteres Regulationspotential existiert in Systemen, bei denen eine HK mehrere RR phosphorylieren kann. Hier herrscht ein Wettbewerb um die Phosphorylgruppen vor (Li *et al.*, 1995). Ein ausgeklügeltes Regulationssystem herrscht auch zwischen den TCS PhoP – PhoQ und PmrA – PmrB in *Salmonella enterica* vor, die über ein Protein miteinander verbunden sind, welches einen RR (PmrA) vor der Dephosphorylierung schützen kann (Eguchi und Utsumi, 2005).

## 1.3 Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* hat 13 Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) und einen einzelnen Responseregulator (Throup *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 1999). Von diesen sind das ComDE-TCS (TCS 12; Pestova *et al.*, 1996), das VncRS-TCS (TCS 10; Haas *et al.*, 2004), das PnpSR-TCS (TCS 04; Novak *et al.*, 1999; McCluskey *et al.*, 2004), das VicRK-TCS (TCS 02; Wagner *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2003), das TCS 06 (Standish *et al.*, 2005), das BlpRH (TCS 13, de Saizieu *et al.*, 2000) und das ZmpSR (TCS09; Blue und Mitchell, 2003) näher untersucht. Für einige der T*CS* aus *S. pneumoniae* konnte eine Beteiligung an der Virulenz gezeigt werden (Paterson *et al.*, 2006).
Das CiaRH-TCS wurde als erstes Zwei-Komponenten-System in *Streptococcus pneumoniae* 1994 identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994). „Cia“ ist die Abkürzung für „**c**ompetence **i**nduction and **a**ltered cefotaxime susceptibility“. Es entspricht in seinem Aufbau dem im vorigen Kapitel geschilderten generellen Prototyp eines Zwei-Komponenten-Systems.

**Pleiotrope Effekte**
In spontanresistenten Labormutanten konnte das Cia-System als erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante gegen β-Laktam-Antibiotika identifiziert werden (siehe Abb. 1.2). Mutationen in CiaH können Resistenz gegenüber Cefotaxim vermitteln. In den untersuchten Mutantenfamilien wurden in verschiedenen Selektionsstufen CiaH-Mutationen gefunden. In drei Familien konnte eine CiaH-Mutation auch in der ersten Selektionsstufe identifiziert werden, weshalb CiaH als primäre Resistenzdeterminante angesehen werden kann.

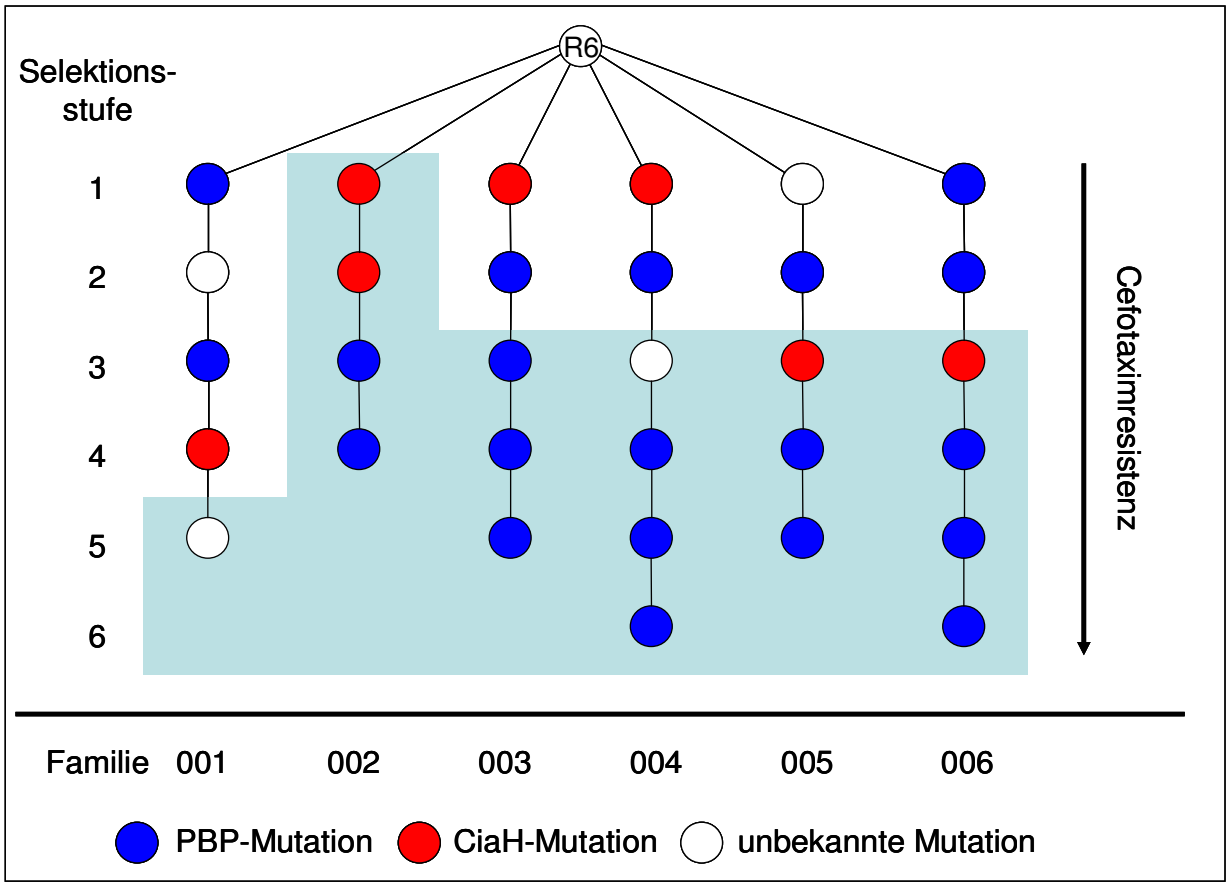



**Abb. 1.2: Spontanresistente Labormutanten**
Dargestellt sind Labormutanten, die nacheinander auf einer steigenden Cefotaximkonzentration selektioniert wurden. Die Benennung der einzelnen Mutanten orientiert sich an der Familie und der Selektionsstufe. So heißt die erste Mutante der Familie 001 C101 (C = Cefotaxim, erste Zahl ist die Selektionsstufe, die letzte Zahl die Familiennummer). Blau untermalt sind die Stufen, ab denen ein Kompetenzverlust aufgetreten ist. Die Farbigkeit der Kreise zeigt die gefundenen Mutationen, wobei in dieser Abb. nicht zwischen Mutationen in den verschiedenen PBPs unterschieden wurde.

In den Mutantenfamilien tritt ab einer bestimmten Selektionsstufe ein Verlust der Transformierbarkeit auf (Guenzi *et al.*, 1994). In allen Fällen ist entweder eine Kombination aus CiaH- und PBP-Mutationen oder nur eine CiaH-Mutation für diesen Verlust verantwortlich. Für die $CiaH_{C306}$-Mutation (Cia „ON"-Mutation), ein Threonin zu Prolin-Austausch an der Position 230 nahe des konservierten Histidins, wurde nachgewiesen, dass diese Punktmutation alleine für den Verlust der genetischen Kompetenz verantwortlich ist (Guenzi *et al.*, 1994). Der Defekt in der Transformierbarkeit ist bei dieser Mutante, wie auch bei allen anderen nicht transformierbaren spontanresistenten Labormutanten, durch externe Zugabe des Kompetenz-induzierenden Peptids (**c**ompetence **s**timulating **p**eptide, CSP; Haverstein *et al.*, 1995) komplementierbar (Zähner *et al.*, 2002). Die $CiaH_{C306}$-Mutation ist homolog zu einem Threonin zu Arginin-Austausch an der Position 247 in dem EnvZ-Protein aus *E. coli*. Dort führt die Punktmutation zu einer verstärkten Phosphorylierung von OmpR durch Verlust der Phosphataseaktivität von EnvZ (Aiba *et al.*, 1989). Für das $CiaH_{C306}$-Protein wurde wegen der Homologie ein ähnlicher Effekt angenommen, d.h. eine erhöhte Phosphorylierungsrate des CiaR-Proteins führt zu einem Cia „ON"-ähnlichen Zustand.
Das Cia-System ist ein wichtiger Bestandteil bei der Pathogenität von *Streptococcus pneumoniae*. So konnte eine drastische Attenuierung der Virulenz in Cia-Deletionsmutanten in intranasalen Lungenkolonisierungsexperimenten von Mäusen (Throup *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2004) und in der Kolonisierung des Nasopharynx von jungen Ratten als einziges von neun untersuchten TCS (Sebert *et al.*, 2002) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in intraperitonealen Infektionen keine Attenuierung der Virulenz bei Cia-Deletionsmutanten (und auch bei keiner anderen TCS-Deletionsmutante) festgestellt werden (Lange *et al.*, 1999). Das Cia-System ist auch involviert in systemischen Infektionen von Mäusen (Marra *et al.*, 2002).
Weitere Cia-abhängige Phänomene sind die verstärkte Autolyse in der stationären Phase von der CiaR-Deletionsmutante (Lange *et al.*, 1999; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) sowie eine erhöhte Resistenz der Mutante mit dem $CiaH_{C306}$-Allel gegenüber Desoxycholat-induzierter Lyse und dem osmotischen Schock bei der Protoplasten-Induktion. Bei dieser Mutante war zusätzlich zur Penicillin-Resistenz eine erhöhte Resistenz gegen Arsenat und Novobiocin, aber eine Hypersensitivität gegenüber Norfloxacin zu beobachten. Außerdem ist ein Cholin-unabhängiges Wachstum der CiaR-Deletionsmutante beschrieben worden (Giammarinaro *et al.*, 1999). Eine Inaktivierung von CiaH führt im Gegensatz zu der Inaktivierung in CiaR nur zu geringen Effekten. Dabei wurde ein gegenteiliger Phänotyp, nämlich Resistenz gegen Cefotaxim, beobachtet (Zähner *et al.*, 1996).
Wie die Fülle der Daten zeigt, scheint das Cia-System ein wichtiges Regulationssystem von *S. pneumoniae* zu sein, dessen Aktivität pleiotrope Effekte zeigt.

**Aufbau und Organisation**
Die genetische Organisation des Cia-Systems ist in Abb. 1.3 wiedergegeben. Das Gen für den Responseregulator (*ciaR*) liegt stromaufwärts von dem Gen für die Histidinkinase (*ciaH*) und wird um acht Basenpaare von diesem überlappt. Beide Gene werden als Operon transkribiert (Giammarinaro *et al.*, 1999).

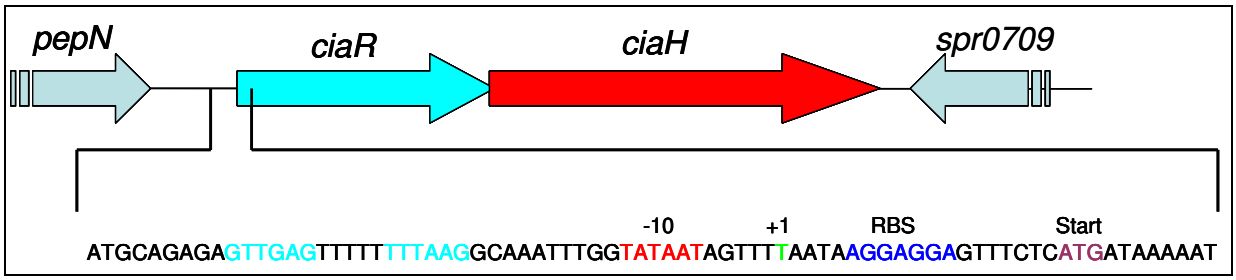



**Abb. 1.3: Genetische Organisation des *ciaRH*-Locus**
Dargestellt sind die vier Gene *pepN*, *ciaRH* und *spr0709*. Die Sequenz zeigt den Abschnitt vor dem *ciaRH*-Operon mit den für die Transkription und Translation wichtigen genetischen Elementen. Türkis eingezeichnet ist die mögliche CiaR-Bindestelle, die -10-Region rot, der +1 (Transkriptionsstart) grün, die Ribosomenbindestelle (RBS) blau und das Startcodon von CiaR lila. Der +1 wurde von Merai (2003) bestimmt.

Vor dem *ciaR*-Gen liegt ein Promotor mit der, für Pneumokokken typischen, erweiterten -10-Region (TGNTATAAT; Sabelnikov *et al.*, 1995) sowie einer möglichen CiaR-Bindestelle (Merai, 2003; Halfmann, 2004). Ein möglicher Transkriptionsterminator findet sich am 3'-Ende des *ciaH*-Gens (Guenzi *et al.*, 1994). Die Phosphorylierungsstellen der beiden Proteine sind der Aspartatrest 51 in CiaR und der Histidinrest 226 in CiaH. Weiterhin findet sich eine Glycin-reiche Region am C-terminalen Ende von CiaH, die eine ATP-Bindestelle darstellen könnte, sowie zwei hydrophobe Bereiche, bei denen es sich um Transmembranregionen handeln könnte. Die Autophosphorylierung des CiaH-Proteins, der Phosphotransfer auf das CiaR-Protein sowie die Bindung des CiaR-Proteins an DNA konnten *in vitro* nachgewiesen werden (Zähner *et al.*, 1996, Merai, 2003). Ein molekulares Signal für das Cia-System konnte bisher nicht identifiziert werden. Als Signale wurden Calciumionen, Phosphationen bzw. Zellwandbausteine diskutiert (Giammarinaro *et al.*, 1999; Hakenbeck *et al.*, 1999).

**Das CiaRH-Regulon**
In drei verschiedenen genomweiten Transkriptionsstudien konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die durch das Cia-System reguliert wurden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Allerdings zeigen diese Studien eine große Diversifikation in den Cia-regulierten Genen, was möglicherweise durch die Verwendung von verschiedenen Stämmen, Medien und z.T. unvollständigen Genomsequenzen als experimentelle Grundlage ihre Ursache hat. Zusätzlich konnte durch die Solid Phase DNA Binding (SPDB)-Technik ein weiterer Satz möglicher Cia-regulierter Gene identifiziert werden (Mascher *et al.*, 2003). Zusammenfassend ist ein minimales Cia-Regulon in Tabelle 1.1 aufgeführt. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Regulation direkt oder indirekt stattfindet.
In der Arbeit von Sebert *et al.* (2002) konnten durch Vergleich eines klinischen Isolates von *S. pneumoniae* mit einer $CiaR^-H^-$-Mutante insgesamt 46 Gene identifiziert werden, die Cia-abhängig transkribiert wurden. 24 dieser Gene wurden durch das Cia-System positiv reguliert, 22 der 46 Gene negativ. Unter diesen 22 negativ regulierten Genen fanden sich auch Gene aus dem Kompetenz-Operon. Die Regulation wurde mittels RT-PCR überprüft. Eine Regulation der anderen in Tabelle 1.1 aufgeführten Gene konnte durch Sebert *et al.* (2002) nicht gezeigt werden.
In der Arbeit von Mascher *et al.* (2003) wurde eine Kombination von Solid Phase DNA Binding (SPDB) Assay und globalen Transkriptionsanalysen benutzt. Mit dem SPDB-Assay können gezielt Fragmente isoliert werden, an die das CiaR-Protein bindet. Diese Technik stellt keine Transkriptionsanalytik dar. Die globalen Transkriptionsanalysen beziehen sich auf einen Vergleich einer $CiaR^-H^-$-Mutante (KP1, Cia „OFF") und der oben erwähnten $CiaH_{C306}$-Mutante (KP3, Cia „ON") mit dem Wildtyp R6 verglichen. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Medien (CpH8- und THB-Medium) und zwei Zeitpunkte der Wachstumskurve verwendet. In CpH8 sind sowohl Wildtyp als auch die $CiaR^-H^-$-Mutante transformierbar, in THB nur die $CiaR^-H^-$-Mutante. Je nach Medium waren z.T. verschiedene Gene signifikant

unterschiedlich exprimiert. Insgesamt zeigte sich aber, dass in der $CiaH_{C306}$-Mutante (Cia „ON“) die meisten Gene höher exprimiert wurden als im Wildtyp, und im Vergleich zur $CiaR^-H^-$-Mutante niedriger. Nur *manLMN*, die *cyl*- und die Kompetenzgene wurden negativ reguliert und zeigten eine verringerte Expression bei Aktivierung des Cia-Systems.

**Tabelle 1.1: Die Gene des minimalen Cia-Regulons**

| Region | Genlocus | Gennummer TIGR4 | Gennummer R6 | SPDB-Assay | Sebert | Mascher KP1 | Mascher KP3 | Dagkessa-manskaia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *manLMN* | *sp0282 – sp0284* | *spr0259 – spr0261* | + | | ↑ | ↓ | ↑ |
| 2 | TCS03 | *sp0386 – sp0387* | *spr0343 – spr0344* | - | | | | ↓ |
| 3 | *ciaRH* | *sp0798 – sp0799* | *spr0707 – spr0708* | - | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| 4 | *spr0782* | *sp0879* | *spr0782* | - | | ↓ | ↑ | |
| 5 | *spr0931* | *sp1027* | *spr0931* | - | ↓ | ↓ | | ↓ |
| 6 | *lic*-Gene | *sp1268 – sp1272* | *spr1145 – spr1149* | + | ↓ | ↓ | ↑ | |
| 7 | *axe* | *sp1695* | *spr1538* | + | | ↓ | ↑ | ↓ |
| 8 | *malPM* | *sp2106 – sp2107* | *spr1916 – spr1917* | + | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| 9 | *dltABCD* | *sp2173 – sp2176* | *spr1979 – spr1982* | + | | ↓ | ↑ | ↓ |
| 10 | *htrA*, *spo0J* | *sp2239 – sp2240* | *spr2045 – spr2046* | + | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| 11 | Kompetenz-gene | | | | ↑ | ↑ | ↓ | * |

Aufgelistet sind die Gene des minimalen Cia-Regulons und ihre Transkription in den Arbeiten von Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004). Die Pfeile deuten die Transkriptionsänderung der Gene im Vergleich zum Wildtyp in der jeweiligen Arbeit an. +/- bei dem SPDB-Assay bezieht sich auf eine Bindung bzw. keine Bindung des CiaR-Proteins. Bei Sebert *et al.* und Dakessamanskaia *et al.* wurden KP1-ähnliche Mutanten (Cia „OFF“) benutzt. *Es wurde eine $comC^{null}$-Mutante benutzt, die keine Kompetenz mehr entwickelt. Ein leeres Feld bedeutet, dass keine Regulation gefunden wurde. KP1 = Cia „OFF“, KP3 = Cia „ON“.

In der Arbeit von Dagkessamanskaia *et al.* (2004) wurde der Zusammenhang zwischen dem Cia-System und der Kompetenz detaillierter analysiert. Hierzu wurden nicht-kompetente Mutanten durch Deletion des *comC*-Gens hergestellt. In diesem Hintergrund wurde anschließend das Cia-System durch eine Antibiotika-Resistenzkassette unterbrochen und das Transkriptionsmuster zum Wildtyp unter nicht-kompetenten und, durch CSP induzierten, kompetenten Bedingungen verglichen. Bis auf die *lic*- und *manLMN*-Gene konnte für alle Gene des minimalen Cia-Regulons (siehe Tabelle 1.1) eine Cia-abhängige Regulation gezeigt werden. Dagkessamanskaia *et al.* (2004) schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Differenzierung der Zellen zum kompetenten Zustand einen Stress für die Zellen verursacht und das Cia-System benötigt wird, um diesen kompetenten Zustand normal zu verlassen. Damit in Übereinstimmung wurden die *ciaRH*-Gene als verzögert CSP-induziert exprimiert beschrieben (Peterson *et al.*, 2004).

Eine detailliertere Analyse der Cia-Regulation von einzelnen Zielgenen konnte durch Reportergenassays durchgeführt werden (Merai, 2003; Halfmann, 2004), in der sich die Cia-abhängige Regulation bestätigte. Zusätzlich konnte durch Band-Shift-Assays und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *ciaR*, *htrA*, *lic* und *manL* eine mögliche CiaR-Bindestelle durch gezielte Suche nach Sequenzmotiven identifiziert werden (Merai, 2003; Halfmann, 2004). Demnach besteht die CiaR-Bindestelle aus direkten Wiederholungen („Direct Repeats“) mit einer je sechs Basenpaaren langen Konsensussequenz, die durch fünf Basenpaare getrennt sind. Für die positiv regulierten Gene *ciaRH*, *htrA* und *lic* befinden sich

diese Bindestellen stromaufwärts des Transkriptionsstarts, bei dem negativ regulierten Gen *manL* liegt diese Bindestelle stromabwärts und ist invertiert. Aus diesen vier potentiellen Bindestellen wurde eine vorläufige Konsensussequenz von 5'(T/G)TT(A/G)AGNNN-NN(T/A)TTAAG3' abgeleitet (Halfmann, 2004; A = Adenin, G = Guanin, T = Thymin, N = beliebige Base).
Das am stärksten durch das Cia-System regulierte Gen ist *htrA* (high-temperature requirement A), dessen Genprodukt eine Zellwand assoziierte Stress-induzierte Serinprotease darstellt. Die Aktivität dieses Proteins kann in einer Temperatur-abhängigen Weise von Chaperon- zu Protease-Aktivität wechseln (Spiess *et al.*, 1999). HtrA ist zum Teil für die, durch das Cia-System verursachten, Effekte verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsphänotypen und die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress von einer HtrA-Deletionsmutante der einer Cia-Deletionsmutante sehr ähnlich waren (Ibrahim *et al.*, 2004). Weiterhin konnte der Kompetenzdefekt der $CiaH_{C306}$-Mutante auf eine Beteiligung des HtrA-Proteins zurückgeführt werden (Sebert *et al.*, 2005).
Die *ciaRH*-Gene wurden durch epithelialen Zellkontakt erhöht exprimiert beschrieben (Orihuela *et al.*, 2004).

## 1.4 Penicillin-Bindeproteine und Resistenz gegen β-Laktam-Antibiotika

Penicillin-Bindeproteine (PBPs) erhielten ihren Namen aufgrund der Eigenschaft Penicillin enzymatisch kovalent zu binden. Sie sind maßgeblich an der Biosynthese der bakteriellen Zellwand beteiligt.

**Verbreitung und Struktur**
In allen Zellwand-bildenden Bakterien wurden bisher PBPs gefunden. Die Zahl der verschiedenen PBPs variiert je nach Bakterium von drei bis acht (Ghuysen, 1991). Sie sind meist mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Allen PBPs – und auch den β-Laktamasen – gemeinsam ist die Penicillin-bindende Transpeptidasedomäne (auch TP-Domäne genannt), die das aktive Serin enthält. Man unterscheidet zwischen PBPs mit niedrigem Molekulargewicht (low molecular weight PBPs oder lmw-PBPs) und solche mit hohem Molekulargewicht (high molecular weight PBPs oder hmw-PBPs) (Ghuysen, 1991).
Die lmw-PBPs besitzen ein Signalpeptid und sind über eine C-terminale Helix mit der Cytoplasmamembran verbunden. Neben der Penicillin-Bindedomäne besitzen sie eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion. Die enzymatische Funktion von lmw-PBPs ist oft eine D,D-Carboxypeptidase-Aktivität. Sie können hierüber den Grad der Quervernetzung des Mureins kontrollieren. Im weiteren Sinne gehören in diese Gruppe auch die β-Laktamasen, die nur die Penicillin-Bindedomäne haben.
Hmw-PBPs weisen mehrere Domänen mit unterschiedlicher Enzymaktivität auf. Neben der Penicillin-bindenden Transpeptidasedomäne gibt es je N-terminal und C-terminal eine weitere Domäne. Eine hydrophobe Region in der Nähe des N-Terminus dient der Verankerung in der Cytoplasmamembran. Man unterscheidet Klasse A und B hmw-PBPs. Klasse A hmw-PBPs sind bifunktionelle Enzyme mit Transglykosylase-Funktion in der N-terminalen Domäne und Transpeptidase-Aktivität in der Penicillin-Bindedomäne. Klasse B hmw-PBPs sind monofunktionelle Enzyme mit nur Transpeptidase-Aktivität. Die Funktion ihrer N-terminalen Domäne ist nicht bekannt.
In *S. pneumoniae* sind sechs PBPs bekannt, von denen die PBPs 1a, 1b und 2a zu den Klasse A hmw-PBPs, 2b und 2x zu den Klasse B hmw-PBPs und das PBP 3 zu den lmw-PBPs gehören (Hakenbeck *et al.*, 1988).

**Funktion**

Die bakterielle Zellwand besteht bei Gram-positiven Bakterien überwiegend aus dem Peptidoglycan, welches auch Murein genannt wird. Bestandteile der Zellwand geringerer Quantität sind die Teichonsäuren und Zellwand-gebundene Oberflächenproteine. Das Murein ist ein Polymer aus alternierenden β-1,4-glykosidisch verbundenen N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäure-Zuckereinheiten. Ein Pentapeptid, in *S. pneumoniae* bestehend aus L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin und D-Alanyl-D-Alanin, ist über die Carboxygruppe an N-Acetylmuraminsäure gebunden, wobei das endständige D-Alanin bei der Synthese des Mureins entfernt wird. Da aufgrund der Konzentration gelöster Ionen im Cytoplasma ein hoher osmotischer Druck innerhalb der Zelle besteht, werden zur höheren Stabilität des Mureins die einzelnen Glycanstränge über ihre Pentapeptide quervernetzt. Durch diese Quervernetzung kann eine Interpeptidbrücke gebildet werden, deren Länge und Zusammensetzung bakterienspezifisch variiert (van Heijenoort, 2001). Bei der Biosynthese des Mureins katalysieren die Penicillin-Bindeproteine die wesentlichen Schritte: die Transglycosylierung von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure sowie die Transpeptidierung, d.h. die Verknüpfung von Glycansträngen über ihre Pentapeptide. Die Energie für die Transpeptidierungsreaktion wird aus der Abspaltung des endständigen D-Alanins gewonnen (D,D-Carboxypeptidierung).

Die bakteriolytische Wirkung der β-Laktam-Antibiotika beruht auf der Hemmung der Murein-Biosynthese durch Inhibierung der Transpeptidasereaktion (Strominger *et al.*, 1967). β-Laktam-Antibiotika sind Strukturanaloga des natürlichen Substrates der Penicillin-Bindeproteine, dem D-Alanyl-D-Alanin-Rest der zu verknüpfenden Pentapeptide. Die PBPs hydrolysieren den β-Laktamring im aktiven Zentrum durch Acylierung des aktiven Serins, wodurch sich ein stabiler Penicilloyl-Enzym-Komplex bildet (Franklin und Snow, 1989). Die Hydrolyse der Acyl-Enzym-Ester-Verbindung ist sehr langsam in PBPs und kann deutlich länger als die Verdopplungszeit des Organismus sein (Fisher *et al.*, 2005). Das Enzym ist daraufhin inaktiviert und steht für eine weitere Murein-Synthese nicht mehr zur Verfügung (Ghuysen, 1991).

**Resistenz gegen β-Laktam-Antibiotika**

Gram-negative Bakterien erlangen Resistenz gegenüber β-Laktam-Antibiotika hauptsächlich durch die Produktion von β-Laktamasen, die sich von den PBPs durch eine hohe Deacylierungsrate unterscheiden. Bei einigen Gram-positiven Bakterien dagegen, wie z.B. den Streptokokken, ist die Ausprägung von PBP-Varianten mit niedriger Affinität zu β-Laktam-Antibiotika der wesentlichste Resistenzmechanismus. Neben diesen beiden Mechanismen sind weitere Möglichkeiten der Resistenzausbildung gegen β-Laktam-Antibiotika bekannt: in Gram-negativen können Effluxsysteme (Okamoto *et al.*, 2001; Pai *et al.*, 2001) und Permeabilitätsbarrieren (Bradford *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2000) beteiligt sein. In Labormutanten von *S. pneumoniae* wurden eine Glykosyltransferase (Grebe *et al.*, 1997) und das, in dieser Arbeit untersuchte, Cia-System (Guenzi *et al.*, 1994) als mögliche Resistenzdeterminanten diskutiert.

In *S. pneumoniae* konnten alle hmw-PBPs in Allelvarianten gefunden werden, die niederaffin zu β-Laktam-Antibiotika sind. PBP2x und PBP2b sind aber als primäre Ziele der meisten β-Laktam-Antibiotika beschrieben (Grebe und Hakenbeck, 1996). Die Vermittlung von Resistenz durch niedrigaffine PBP1a-Varianten bedingt das Vorhandensein von niedrigaffinen PBP2x oder PBP2b (Barcus *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 1992; Reichmann *et al.*, 1996). In den spontanresistenten Labormutanten (siehe Abb. 1.2) treten neben PBP2x auch PBP2a-Mutationen auf, die einen Einfluss von PBP2a auf die Resistenzausbildung nahe legen (Hakenbeck *et al.*, 1998). Die Rolle von PBP1b bei der Ausbildung der Resistenz ist bislang ungeklärt (Laible und Hakenbeck, 1991).

In resistenten klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten finden sich Mosaikstrukturen in den PBP-Proteinen. Diese werden durch Transfer und Rekombination von resistenzvermittelnden *pbp*-Allelen in sensitive Stämme gebildet. Durch Rekombinationsereignisse entstehen Mosaikgene, die sich in den rekombinierten Bereichen zu ca. 20% unterscheiden (Dowson *et al.*, 1989; Laible *et al.*, 1991). In Labormutanten entsteht Resistenz durch Selektion von Punktmutationen (siehe Abb. 1.2). Diese vermitteln ebenso wie Mosaikgene eine geringere Affinität gegenüber β-Laktam-Antibiotika. Resistenzvermittelnde Punktmutationen finden sich generell in der Transpeptidasedomäne (Grebe und Hakenbeck, 1996; Laible und Hakenbeck, 1991). Eine Modifikation des lmw-PBP3 konnte bislang nur in Labormutanten beschrieben werden (Krauß und Hakenbeck, 1997). Allerdings scheinen Veränderungen in der vorhandenen Menge des PBP3-Proteins die Resistenz gegen β-Laktam-Antibiotika beeinflussen zu können (Selekovitch-Chenu *et al.*, 1993/ 1997).

## 1.5 Kompetenz von *S. pneumoniae*

Unter natürlicher Kompetenz versteht man einen „genetisch programmierten physiologischen Zustand, der die effiziente Aufnahme von DNA ermöglicht“ (Dubnau, 1999). Dieser Zustand kann sowohl bei Gram-positiven (*B. subtilis*, *S. pneumoniae*) als auch bei Gram-negativen Bakterien (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) vorkommen (Solomon und Grossman, 1996; Dubnau, 1999).
Die Fähigkeit der natürlichen DNA-Aufnahme bei *S. pneumoniae* wurde zuerst von Griffith (1928) und Avery *et al.* (1944) beschrieben. Sie ist bei *S. pneumoniae* im Gegensatz zu anderen Bakterienarten nicht über die gesamte Wachstumsphase ausgeprägt, sondern nur auf eine kurze Phase des exponentiellen Wachstums beschränkt, in der alle Zellen einer Kultur gleichzeitig kompetent werden. Um diese Gleichzeitigkeit zu erreichen, müssen die Zellen einer Population miteinander kommunizieren und auf die Anwesenheit von anderen Bakterienzellen oder deren Stoffwechselprodukten reagieren.
Warum *S. pneumoniae* eine natürliche Kompetenz ausbildet, ist nicht vollständig geklärt. Zum einen wird die Kompetenz für die Ausbildung der vollen Virulenz benötigt (Guiral *et al.*, 2005). Zum anderen spielt sie wahrscheinlich bei der Ausbreitung von Resistenz- und Pathogenitäts-relevanten Allelen durch horizontalen Gentransfer eine große Rolle (Dowson *et al.*, 1997; Hakenbeck *et al.*, 1998).
Der Prozess der Transformation kann in vier Schritte untergliedert werden: DNA-Bindung an die Zelle, DNA-Fragmentierung, DNA-Aufnahme und DNA-Rekombination bzw. Metabolisierung, wenn keine homologe DNA zur Rekombination vorhanden ist.
Bei *S. pneumoniae* und *B. subtilis* sind keine Erkennungssequenzen für die DNA-Aufnahme erforderlich, wie es bei Gram-negativen Bakterien oft der Fall ist (Solomon und Grossmann, 1996). Doppelsträngige DNA wird an die Zelloberfläche gebunden und im zweiten Schritt fragmentiert. Hierbei werden von Einzelstrangbrüchen beginnend die beiden Stränge voneinander getrennt (Lacks, 1979). Von den DNA-Fragmenten, die ca. 6 kb lang sind, wird ein Strang abgebaut, wohingegen der zweite linear aufgenommen wird (Méjean und Claverys, 1988). Sobald die DNA in der Zelle vorhanden ist, wird diese vor intrazellulärem Abbau durch Anlagerung des SSB (**s**ingle-**s**tranded DNA **b**inding protein) geschützt (Morrison und Mannarelli, 1979). Ist die aufgenommene DNA heterolog zu der DNA des Wirtes, wird sie verstoffwechselt, ist sie hingegen homolog, kann sie über den RecA-vermittelten Rekombinationsweg in das Chromosom integriert werden.
Die Ausbildung der Kompetenz ist von verschiedenen Bedingungen abhängig, wie z.B. Konzentration an divalenten Kationen, Cholin- und Phosphatgehalt sowie $H^+$-Konzentration des Mediums (Tomasz, 1965; Trombe, 1993; Dintilhac und Claverys, 1997; Novak *et al.*, 1999; Chen und Morrison, 1987). Weiterhin können die $O_2$-Konzentration sowie einige

Proteine, inklusive des Cia-TCS, die Transformationseffizienz beeinflussen (Echenique *et al.*, 2000; Pearce *et al.*, 1994; Alloing *et al.*, 1998; Guenzi *et al.*, 1994).

**Molekulare Regulation der Kompetenz**

Die Regulation der Kompetenz bei *S. pneumoniae* ist in den letzten Jahren ausführlicher untersucht worden. Sie ist ein Zelldichte-abhängiger Prozess, der durch die Sekretion eines chemischen Signals zu einer koordinierten Genexpression innerhalb einer Population führt. Ein Peptid, das aus 17 Aminosäure-Resten besteht, reguliert konzentrationsabhängig die Kompetenz. Deshalb wird es CSP (**c**ompetence **s**timulation **p**eptid) genannt (Haverstein *et al.*, 1995). Das CSP-Peptid ist das prozessierte Genprodukt des *comC*-Gens und wird als 41 Aminosäuren langes Vorläuferpeptid mit einem Doppel-Glycin-Signalpeptid gebildet (Havarstein *et al.*, 1995). Dieses Vorläuferpeptid wird durch einen ATP-abhängigen Transportprozess, vermittelt durch die Proteine ComA und ComB, ins Medium abgegeben und dabei durch das ComA-Protein prozessiert, welches eine N-terminale proteolytische Domäne enthält (Hui *et al.*, 1995). Das *comC*-Gen wird in nicht-kompetenten Zellen nur in sehr geringen Mengen transkribiert (Pestova *et al.*, 1996). Das CSP-Protein dient als Signal für ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus den Proteinen ComD und ComE (Pestova *et al.*, 1996). ComD stellt eine Histidinkinase dar, welche in die $HPK_{10}$-Unterfamilie eingeteilt wird und keine D-Box und nur ein Asparagin in der N-Box enthält (Grebe und Stock, 1999). Zusätzlich enthält ihre Membrandomäne wahrscheinlich 6 oder 7 Membranhelices (Cserzo *et al.*, 1997; Persson und Argos, 1997). ComD überträgt einen Phosphatrest nach Signalinduktion auf den Responseregulator ComE. Dieser bindet an eine neun Basenpaare lange direkte Wiederholungssequenz („direct Repeat“), die durch 12 Basenpaare getrennt ist (Pestova *et al.*, 1996; Ween *et al.*, 1999) und in den Promotorregionen stromaufwärts der *comCDE* und *comAB*-Gene gefunden wurde. Alle fünf Gene gehören zu einem autokatalytischen Quorum-Sensing-System, welches für die explosionsartige Induktion der Kompetenz essentiell ist (siehe Abb. 1.4). Es konnten sogenannte Pherotypen nachgewiesen werden, bei denen Allelvarianten des Pheromons CSP mit Veränderungen in der Sensordomäne des ComD-Proteins einhergehen (Pozzi *et al.*, 1996; Havarstein *et al.*, 1997; Morrison, 1997).

Neben den „frühen“ Kompetenzgenen *comABCDE* wurden auch „späte“ Kompetenzgene beschrieben (Peterson *et al.*, 2000; Rimini *et al.*, 2000). Diese werden durch einen alternativen Sigmafaktor, ComX, reguliert. Die Promotorregionen der beiden identischen *comX*-Allele enthalten einen imperfekten direkten Repeat, ähnlich der Bindestelle für ComE. Aufgrund von zwei Austauschen von Thymin zu Adenin in den rechten Repeats, haben diese Bindestellen vermutlich nur eine geringe Affinität zum ComE-Protein (Claverys und Havarstein, 2002). Vermutlich führt der Autoinduktionsprozess der ComABCDE-Proteine zu einem starken Anstieg an phosphoryliertem ComE, welches dann die ComX-Expression anschalten kann. Die späten Kompetenzgene besitzen eine cin-Box, die auch com-Box genannt wird, und sind an der Bindung, Prozessierung, Aufnahme und Rekombination der DNA beteiligt. Die com-Box ist die Bindestelle des ComX-Proteins und besteht aus einer zur Pribnow-Box deutlich unterschiedlichen konservierten -10-Sequenz, was für alternative Sigmafaktoren typisch ist (Lee und Morrison, 1999). Die Promotorregionen der frühen Kompetenzgene besitzen keine com-Box (Campbell *et al.*, 1998).

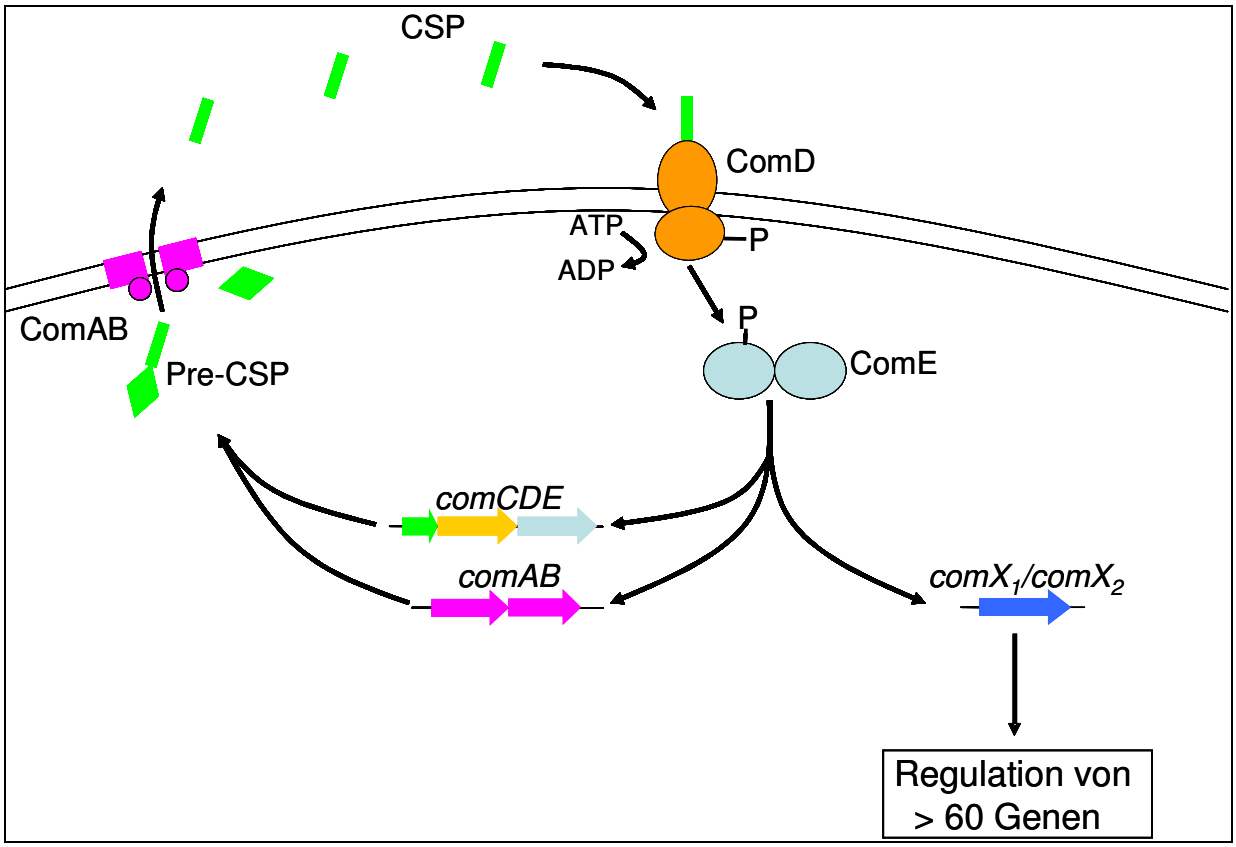



**Abb. 1.4: Regulation der Kompetenz**
Dargestellt ist der autoregulatorische Kreislauf der ComABCDE-Proteine. Die ComDE-Proteine stellen ein Zwei-Komponenten-System dar. *ComC* kodiert für das Vorläuferpeptid von CSP, welches durch ComAB abgespalten und transportiert wird. ComD erkennt das prozessierte CSP und phosphoryliert ComE. Phosphoryliertes ComE wirkt als DNA-bindender Transkriptionsfaktor.

Genomweite Transkriptionsanalysen erlaubten eine vollständigere Beschreibung des Kompetenzregulons (Campbell *et al.*, 1998; Claverys und Martin, 1998; Havarstein, 1998; Peterson *et al.*, 2000; Rimini *et al.*, 2000; Bartilson *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2004) und klassifizierten die Gene in „frühe“, „späte“, „verzögerte“ und „reprimierte“ Kompetenzgene.
Wie der positiv autokatalytische Induktionsprozess der Kompetenz abgeschaltet wird, ist bislang noch nicht geklärt. Für das ComX-Protein, welches nur bis zu 15 Minuten nach CSP-Induktion nachweisbar ist (Claverys und Havarstein, 2002), wurde ein proteolytischer Abbau postuliert (Tortosa und Dubnau, 1999). Für die Abschaltung der frühen Kompetenzgene wurde ein Selbst-Limitierungsprozess (Claverys und Havarstein, 2002), das Wirken von ComE als Inhibitor bei unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden, eine ComE-spezifische Phosphatase (Alloing *et al.*, 1998) oder die Aktivität eines Repressors, der an den imperfekten Repeat vor *comCDE* bindet (Ween *et al.*, 1999), postuliert. Auch das Cia-System wurde beschrieben, um den bei der Kompetenz entstandenen Stress zu reduzieren und aus dem Kompetenz-Status normal herauszukommen (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die CiaH-vermittelte Cefotaximresistenz sowie mögliche Cia-Zielgene, deren Produkte in der Zellwand agieren, ließen eine Beteiligung des Cia-Systems an der Stabilität der Zellwand vermuten. Bisher wurden keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss des Cia-Systems auf die Stabilität der Zellwand durchgeführt. Dies sollte in dieser Arbeit durch Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Zellwand-aktiver Substanzen, z.B. Antibiotika, auf Cia-Mutanten untersucht werden. Von besonderer Bedeutung war dabei die Bereitstellung von Mutanten mit aktiviertem Cia-System gegenüber solchen, denen das Cia-System fehlte („ON“ versus „OFF“). Zusätzlich sollte ein eindeutiger und leicht zu testender Cia „OFF“-Phänotyp herausgearbeitet werden, damit auf phänotypischer Ebene durch Inaktivierung von Cia-Zielgenen nach den Ursachen dieses Phänotyps gesucht werden kann. Diese Beteiligung von Cia-regulierten Genen wurde auf phänotypischer Ebene, d.h. Resistenz und Kompetenz, untersucht. Hierbei sollte das Fehlen eines Proteins, welches zum Cia-Regulon gehört, den Cia „OFF“-Phänotyp zum Teil oder vollständig verursachen.
Die Inaktivierung von CiaH zeigt einen anderen Phänotyp als die Inaktivierung von CiaR. Die Resistenz gegenüber Cefotaxim kann durch Inaktivierung von CiaH gesteigert, durch Inaktivierung von CiaR gesenkt werden. Dieser Unterschied kann möglicherweise durch die Involvierung von CiaH in ein regulatorisches Netzwerk mit anderen Histidinkinasen erklärt werden. Deshalb sollten Inaktivierungen von CiaH und jeweils einer weiteren Histidinkinase durchgeführt werden, um die Beteiligung von CiaH an einem solchen Netzwerk nachzuweisen. Der Nachweis sollte auf phänotypischer Ebene durch Entstehung des Cia „OFF“-Phänotyps gezeigt werden.
Da aufgrund der limitierten und inzwischen nicht mehr zur Verfügung stehenden Affymetrix-Chips, die auf einer damals noch unvollständigen Genomsequenz basierten, die experimentellen Möglichkeiten in der Arbeit von Mascher (2001) begrenzt waren, sollten mit Hilfe von globalen Transkriptionsvergleichen diese Experimente überprüft und erweitert werden. Weiterhin sollte eine Aktivierbarkeit des Cia-Systems durch Stimuli, z.B. Antibiotika oder PBP2x-Mutationen, mit Transkriptionsstudien untersucht werden. Diese Fragestellungen sollten mit der Oligo-basierten Mikroarray-Technik beantwortet werden. Das verwendete Oligo-Set musste dazu experimentell evaluiert werden. Die Funktionsfähigkeit der Technik und die Brauchbarkeit des Oligo-Sets sollte anhand von genomischen DNA-Vergleichen gezeigt werden.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits

In den Tabellen 2.1 bis 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Enzyme, Chemikalien und Kits sowie deren Bezugsquellen aufgeführt.

**Tab. 2.1: Benutzte Geräte**

| Gerät | Firma |
|---|---|
| Mikroskop Nikon Eclipse E600 mit CCD-1300B-Kamera | Nikon GmbH, Düsseldorf |
| T1 Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| LightCycler 2.0 mit LC Carousel Centrifuge 2.0 | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Milliporewasseranlage Milli-Q | Millipore, Billerica, USA |
| Speed-Vac mit Kühlfalle | SVC 100, Savant, Farmingdale, NY,<br>Refrigated Condensation Trap, RT100, Savant |
| SpotArray™24 Microarray Spotting System | PerkinElmer, Wellesley, USA |
| Pins für Spotter | SMP3-Pins von Telechem, Sunnyvale, USA |
| GenPure-Wasseraufbereitungsanlage | TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert |
| Ultraschallbad | Bandelin Sonorex RK100H, Bandelin *electronic*, Berlin |
| ScanArray®4000 Microarray Analysis System | PerkinElmer, Wellesley, USA |
| Schwenkwasserbad | UNITHERM HB auf UNITWIST, UniEquip, Martinsried |
| Hybridisierungsmaschine HS400 | Tecan, Crailsheim |
| 3D-Wipptisch | Rocky 3D, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau |
| Floatable Cleaning Rack, MicroCleaning Solution | Telechem, Sunnyvale, USA |
| Spezialzahnbürste für Mikroarray-Spotter | Oral-B, Interdental Set mit konisch (3,2 – 6,0 mm) feinen Zahnbürsten |
| Adhäsionsfolien für Mikrptiterplatten | Excel Scientific, Wrightwood, USA |
| Kleberahmen für Slides | Extra große (300 µl), ThermoElectron, Waltham, USA |
| Nexterion® Slides E, Nexterion® Hyb Puffer | Schott AG, Mainz |
| Transilluminator | ONCOR® Appligene®, Heidelberg |
| Geldokumentationsanlage | Digit-Store duo-Systems, INTAS, Göttingen |
| Hybridisierungskammer | MWG Biotech AG, Ebersberg |
| Fluorimager 595 | Molecular Dynamics, Sunnyvale |
| NanoDrop | ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |

**Tab. 2.2: Verwendete Enzyme und deren Bezugsquellen**

| Enzym | Bezugsquelle |
|---|---|
| DNase I, RNase-frei | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| RNase A | Sigma-Aldrich Co., München |
| Proteinase K | Roth, Dautphetal-Buchenau |
| RNasin | Promega, Madison, USA |
| Goldstar-Polymerase | Eurogentec, Seraing, Belgien |
| Pfu-Polymerase | Stratagene, La Jolla, USA |
| Klenow-Enzym | USB Co., Cleveland, USA |

**Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen**

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|---|---|
| Todd-Hewitt-Broth, Casaminoacids, Neopepton, Hefeextrakt, Bactopepton | Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA |
| Defibriniertes Schafsblut | Oxoid GmbH, Wesel |
| L-Tryptophan, Adenosin, Biotin, Cefotaxim, Piperacillin, Vancomycin, Bacitracin, D-Cycloserin, Phosphomycin, Nisin, DEPC, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl, Riboflavin, Nicotinsäure | Sigma-Aldrich Co., München |
| Orange G | Merck KGaA, Darmstadt |
| Glutamin, L-Cystein, Uridin, Ca-Pantothenat, Streptomycin, Spektinomycin, Erythromycin, BSA, Natriumdesoxycholat | AppliChem, Darmstadt |
| Gallidermin | Genmedics, Reutlingen |
| Kanamycin | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Chloramphenicol, Hefe-tRNA | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| CSP | Institut für medizinische Immunologie, Berlin |
| 2-Mercaptoethanol, Microscope Slides | Roth, Dautphetal-Buchenau |
| Glykogen, dNTPs (einzeln, je 100 mM) | Peqlab, Erlangen |
| RNaseZAP, Acid Phenol/Chloroform | Ambion, Austin, USA |
| Bocillin | Mobitec, Göttingen |
| „Phase Lock Gel™“-Röhrchen | Eppendorf, Hamburg |
| Agarose | Cambrex, New Jersey, USA |
| Cy3-/Cy5-dCTP | PerkinElmer, Wellesley, USA |
| Random Hexamere, Random Cy3-Nonamere | Operon, Huntsville, USA |
| salzhaltiger Hybridisierungspuffer, Random Oktamere | MWG Biotech AG, Ebersberg |
| DyeSaver-Lösung | Genisphere, Hatfield, USA |

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden überwiegend von den Firmen Merck KGaA und AppliChem bezogen.

**Tab. 2.4: Verwendete Standards und Kits**

| Standards und Kits | Firma |
|---|---|
| Wizard® Genomic DNA Purification Kit | Promega, Madison, USA |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Jet Quick PCR Purification Spin Kit | Genomed, Löhne |
| RNeasy® Midi/Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| LightCycler® Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I kit | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Labelstar™-Kit | Qiagen, Hilden |
| GeneRuler 1bk-DNA ladder | MBI Fermentas, St. Leon Rot, USA |
| RNA Ladder High Range ready-to-use | MBI Fermentas, St. Leon Rot, USA |
| Dalton Mark VII-L for SDS Gel Electrophoresis | Sigma-Aldrich Co., München |

## 2.2 Bakterienstämme

In der Tabelle 2.5 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

**Tab. 2.5: Verwendete *S. pneumoniae*-Stämme**

| Ausgangs-stamm | Merkmale | | Referenz |
|---|---|---|---|
| R6 | R36A-Derivat, kapselfrei | | Ottolenghi und Hotchkiss, 1962 |
| KNr.7/87 (TIGR4) | Bekapselt (Serotyp 4) | | Aaberge *et al.*, 1995 |
| Stamm | Von R6 abweichende Merkmale | | Referenz |
| | auf DNA-Ebene | auf Protein-Ebene/Bemerkung[1] | |
| KP1 | *ciaR*::*aad9*[2] | | Zähner, 1999 |
| KP2 | *ciaH*::*aad9* | | Zähner, 1999 |
| KP3 | $ciaH_{C306}$ C688A | $CiaH_{C306}$ T230P | Guenzi *et al.*, 1994 |
| AmiA9 | *str* A167C | Str L56T | Sicard, 1964; Salles, 1992 |
| C103 | $ciaH_{C103}$ C608T | $CiaH_{C103}$ A203V | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| C203 | $ciaH_{C103}$ C608T, *pbp2x* G1790A | $CiaH_{C103}$ A203V, PBP2x G597D | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| C303 | $ciaH_{C103}$ C608T *pbp2x* G1790A, A1648G | $CiaH_{C103}$ A203V, PBP2x G597D T550A | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| C403 | $ciaH_{C103}$ C608T *pbp2x* G1790A, A1648G *pbp2a* Repeat 84-91 | $CiaH_{C103}$ A203V, PBP2x G597D T550A, PBP2a Stop ab 42 | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| C503 | $ciaH_{C103}$ C608T *pbp2x* G1790A, A1648G, C1276T *pbp2a* Repeat 84-91 | $CiaH_{C103}$ A203V, PBP2x G597D T550A R426C, PBP2a Stop ab 42 | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| C606 | $ciaH_{C306}$ C688A, *pbp2x* G1802T, G1790A, T866C, G1265A, pbp2a Repeat 1569-1687 | PBP2x G601V G597D M289T G422D, CiaH T230P, PBP2a Stop ab 566 | Laible und Hakenbeck, 1991 |
| KP101 | *pbp1a*::pUC18 | | Paik *et al.*, 1999 |
| KP102 | *pbp1b*::pUC18 | | Paik *et al.*, 1999 |
| KP103 | *pbp2a*::pJDC9 | | Rutschmann, 2003 |
| KP104 | $pbp2b_{2349}$ (339 – 1590 aus *pbp2b* von *S. p.* 2349) | | Chi, 2004 |
| KP105 | $pbp2x_{2349}$ (696 – 2112 aus *pbp2x* von *S. p.* 2349) | | Bergmann, 2003 |
| $R6_{pbp2x}^{C303}$ | *pbp2x* G1790A, A1648G | PBP2x G597D T550A | Mascher, 2001 |
| $R6_T$-CCCB | $pbp1a_{S.\ mitis}$, $pbp1b_{S.\ mitis}$, $pbp2a_{S.\ mitis}$, $pbp2b_{S.\ mitis}$, $pbp2x_{S.\ mitis}$ | | Hakenbeck *et al.*, 1998 |
| KP111 | *pbp1a*::pUC18, *ciaR*::*aad9* | | diese Arbeit |
| KP112 | *pbp1b*::pUC18, *ciaR*::*aad9* | | diese Arbeit |
| KP113 | *pbp2a*::pJDC9, *ciaR*::*aad9* | | diese Arbeit |
| KP114 | $pbp2b_{2349}$, *ciaR*::*aad9* | | diese Arbeit |
| KP115 | $pbp2x_{2349}$, *ciaR*::*aad9* | | diese Arbeit |
| $C203R^-H^-$ | *ciaR*::*aad9*, $ciaH_{C306}$ C688A *pbp2x* G1790A | | diese Arbeit |
| $C303R^-H^-$ | *ciaR*::*aad9*, $ciaH_{C306}$ C688A *pbp2x* G1790A, A1648G | | diese Arbeit |
| KP116 | *ciaR*::*aad9*, $pbp1a_{S.\ mitis}$, $pbp1b_{S.\ mitis}$, $pbp2a_{S.\ mitis}$, $pbp2b_{S.\ mitis}$, $pbp2x_{S.\ mitis}$ | | diese Arbeit |
| KP201 | *spr0261::ermAM* | *spr0261 = manL* | diese Arbeit |

**Fortsetzung Tabelle 2.5**

| | | | |
|---|---|---|---|
| KP202 | *spr0782*::*ermAM* | | diese Arbeit |
| KP203 | *spr0931*::*ermAM* | | diese Arbeit |
| KP204 | *spr1917*::*ermAM* | *spr1917 = malM* | diese Arbeit |
| KP205 | *spr1982*::*ermAM* | *spr1982 = dltA* | diese Arbeit |
| KP206 | *spr2045*::*ermAM* | *spr2045 = htrA* | diese Arbeit |
| KP211 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr0261*::*ermAM* | *spr0261 = manL* | diese Arbeit |
| KP212 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr0782*::*ermAM* | | diese Arbeit |
| KP213 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr0931*::*ermAM* | | diese Arbeit |
| KP214 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr1917*::*ermAM* | *spr1917 = malM* | diese Arbeit |
| KP215 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr1982*::*ermAM* | *spr1982 = dltA* | diese Arbeit |
| KP216 | $ciaH_{C306}$ C688A, *spr2045*::*ermAM* | *spr2045 = htrA* | diese Arbeit |
| KP301 | *spr1473*::*ermAM* | Spr1473 = HK01 | diese Arbeit |
| KP302 | *spr0343*::*ermAM* | Spr0343 = HK03 | diese Arbeit |
| KP303 | *spr0579*::*ermAM* | Spr0579 = HK09 | diese Arbeit |
| KP304 | *spr0464*::*ermAM* | Spr0464 = HK13 | diese Arbeit |
| KP305 | *ciaH*::*aad9*, *spr1473*::*ermAM* | Spr1473 = HK01 | diese Arbeit |
| KP306 | *ciaH*::*aad9*, *spr1106*::*ermAM* | Spr1106 = HK02 | diese Arbeit |
| KP307 | *ciaH*::*aad9*, *spr0343*::*ermAM* | Spr0343 = HK03 | diese Arbeit |
| KP308 | *ciaH*::*aad9*, *spr1894*::*ermAM* | Spr1894 = HK04 | diese Arbeit |
| KP309 | *ciaH*::*aad9*, *spr1997*::*ermAM* | Spr1997 = HK06 | diese Arbeit |
| KP310 | *ciaH*::*aad9*, *spr0153*::*ermAM* | Spr0153 = HK07 | diese Arbeit |
| KP311 | *ciaH*::*aad9*, *spr0077*::*ermAM* | Spr0077 = HK08 | diese Arbeit |
| KP312 | *ciaH*::*aad9*, *spr0579*::*ermAM* | Spr0579 = HK09 | diese Arbeit |
| KP313 | *ciaH*::*aad9*, *spr0529*::*ermAM* | Spr0529 = HK10 | diese Arbeit |
| KP314 | *ciaH*::*aad9*, *spr1815*::kan-rps$L^+$ | Spr1815 = HK11 | diese Arbeit |
| KP315 | *ciaH*::*aad9*, *spr2042*::kan-rps$L^+$ | Spr2042 = HK12 | diese Arbeit |
| KP316 | *ciaH*::*aad9*, *spr0464*::*ermAM* | Spr0464 = HK13 | diese Arbeit |

*S. p.* 2349 = mehrfach Antibiotika-resistentes klinisches Isolat aus Spanien, 23F-Serotyp (Reichmann *et al.*, 1997); [1]einzelne Punktmutationen auf Proteinebene und zum Verständnis wichtige Informationen sind angegeben; [2]*aad9* = Spektinomycin-Resistenzgen (Dunny *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991)

## 2.3 Oligonukleotide

Die in den folgenden Tabellen genannten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg) und Operon Biotechnologies (Huntsville, USA) hergestellt. Die Stammlösungen der Oligonukleotide haben eine Konzentration von 100 pmol in 1 x TE-Puffer und wurden bei –20°C gelagert. Zum Gebrauch wurden die Stammlösungen 1:10 in $H_2O_{dest.}$ verdünnt.
Das *Streptococcus pneumoniae R6* Oligos-Set wurde von der Firma MWG-Biotech AG bezogen.

**Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Amplifikation von *ciaRH***

| Name | Position[1] | Sequenz |
|---|---|---|
| 4989 | 707295 – 707316 | CGGGATCCATAAAAATCTTATTGGTTGAGG |
| 4991 | 707852 – 707829 | CCCAAGCTTAATCGTTGTATCACTATCAAATCC |
| 4993 | 709290 – 709265 | CCCAAGCTTATTTTTTCTTTTTAGATGGTGTCT |
| 4994 | 708079 – 708100 | CGGGATCCAGTCTTTATACTTCGGTGGACG |
| CiaR1for | 707226 – 707253 | ATGCAGAGAGTTGAGTTTTTTTTAAGGC |
| CiaR721rev | 707948 – 707922 | AAGATACCCAACACTACGCAAGGTTTG |

[1]Die aufgeführten Positionsangaben beziehen sich auf die unter der GenBank-Nummer NC_003098 abgelegte *S. pneumoniae* R6-Sequenz (NCBI).

**Tab. 2.7: Oligonukleotide zur Konstruktion von Cia-Zielgen-Inaktivierungen**

| Gen, auf das sich das Oligo bezieht | Name | Position[1] | Sequenz |
|---|---|---|---|
| | ErmAM_for_Link1 | | CCGCCGCGGCAG CAAAGAATGGCGGAAACG |
| | ErmAM_rev_Link2 | | CGTCGTCGTCGC CTTTAGTAACGTGTAACTTCC |
| | ErmAM_for_L1a | | CCGCCGCGGCAGGCCGCCGC AGCAAAGAATGGCGGAAACG |
| | ErmAM_rev_L2a | | TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG CTTTAGTAACGTGTAACTTTCC |
| *spr0261* | A_261_for | 262092 – 262109 | GAGGATGCCTTCAAGACC |
| *spr0261* | A_261_revL1a | 262815 – 262797 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG TAATATCATTAAAGAAGCC |
| *spr0261* | B_261_forL2a | 263327 – 263345 | CGACGACGACGACGACGACGA AAGAGTGATTCTTACTAGC |
| *spr0261* | B_261_rev | 264026 – 264008 | ATGGCTGAACAATGTATCG |
| *spr0782* | 782_A_for | 779703 – 779722 | TTCCCAGTCTGAGTACAAGC |
| *spr0782* | 782_A_revL1a | 780499 – 780478 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG CTACTCCTGCTTCAAGTAAACC |
| *spr0782* | 782_B_forL2a | 780858 – 780881 | CGACGACGACGACGACGACGA TTGATTATGATTTATTATACTCTG |
| *spr0782* | 782_B_rev | 781838 – 781817 | CTGAAAAGACAAAAATATCCGG |
| *spr0931* | A_931_for | 916182 – 916201 | CTCTAAAGAAGTAAAGGAGG |
| *spr0931* | A_931_revL1 | 916584 – 916568 | GCCGCGGCGGGG TACATATCCTGAGTTAC |
| *spr0931* | B_931_forL2 | 916716 – 916733 | CGACGACGACGC AAGCCAATAAAGATTTGG |
| *spr0931* | B_931_rev | 917163 – 917145 | AAGTTGACAAGGGCTTGCC |
| *spr1916* | mal_A_for | 1898319 – 1898337 | TCTCATTACGGTACCAACC |
| *spr1916* | mal_A_revL1a | 1899039 – 1899021 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG GCTCGTAAAGCTTCAGCAC |
| *spr1916* | mal_B_forL2a | 1900603 – 1900622 | CGACGACGACGACGACGACGA GCTAAAGATAGCAAATACGC |
| *spr1916* | mal_B_rev | 1901330 – 1901331 | TCTTTGATCAATGTTACAGC |
| *spr1982* | A_1982_for | 1972995 – 1973014 | TCGTCAATGATAAAGGTTGG |
| *spr1982* | A_1982_revL1a | 1973707 – 1973687 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG GAGCCAAGCTTGATTATTGCC |
| *spr1982* | B_1982_forL2a | 1974208 – 1974226 | CGACGACGACGACGACGACGA AAGAGTGATTCTTACTAGC |
| *spr1982* | B_1982_rev | 1974988 – 1974968 | AATACGATTTGGGTTTCTTCC |
| *spr2045* | htrA_A_for | 2035643 – 2035661 | CGAACCTGCGACCGTTCGC |
| *spr2045* | htrA_A_revL1a | 2036307 – 2036286 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG GAAATTGTGATTTTCTTAATTG |
| *spr2045* | htrA_B_forL2a | 2037022 – 2037042 | CGACGACGACGACGACGACGA GAAATGTATCCTTAAAATCGG |
| *spr2045* | htrA_B_rev | 2037676 – 2037657 | TCTGTGATAGAAATCATTTC |

[1]Die angegebenen Positionsangaben beziehen sich auf die unter der GenBank-Nummer NC_003098 abgelegte *S. pneumoniae* R6-Sequenz (NCBI). Die unterstrichenen Sequenzen sind Linkersequenzen, für die die Positionsangaben nicht gelten.

**Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Konstruktion von Histidinkinasen-Inaktivierungen**

| Gen, auf das sich das Oligo bezieht | Name | Position[1] | Sequenz |
|---|---|---|---|
| | janus_forL1a | | CCGCCGCGGCAGGCCGCCGC TATTCCAGAGGAAATGGATCGG |
| | janus_revL2a | | TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG CTTTCCTTATGCTTTTGGACG |
| *spr1473* | HK01_for | 1453790 – 1453814 | GATATCGCCAACAAATCACGCGTTG |
| *spr1473* | HK01_rev | 1454945 – 1454923 | ACCCTCTCTGTCAATGTGGCTCG |
| *spr1106* | HK02P1 | 1108053 – 1108032 | GATAAGGTTATCGGTTTGGAAC |
| *spr1106* | HK02P4 | 1105878 – 1105898 | TGGCTTACACCAAAACTCTCG |
| *spr0343* | HK03_for | 347634 – 347660 | CCACTATGATTGGTGATGTGGAGGTGG |
| *spr0343* | HK03_rev | 348763 – 348737 | CACAACTTCTACATCGTCTTGGAGGTC |
| *spr1894* | HK04P1 | 1872410 – 1872431 | TCTGCGAAAAGTGATGAATTTG |
| *spr1894* | HK04P4 | 1874772 – 1874754 | TGAAGGGACGTTGAAGAGG |
| *spr1997* | HK06P1 | 1992250 – 1992231 | AGGTTATCATGTCATTATGGC |
| *spr1997* | HK06P4 | 1990766 – 1990784 | GACACTCTGTCCACTCTTG |
| *spr0153* | HK07_A_for | 160950 – 160970 | TGCAATCTTACTCTCTTACGC |
| *spr0153* | HK07_A_revL1a | 161965 – 161945 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG ACATGCGCAAGAACTCCAGCG |
| *spr0153* | HK07_B_forL2a | 162472 – 162491 | CGACGACGACGACGACGACGA GAGTCTGCAGAGCAAGCCGG |
| *spr0153* | HK07_B_rev | 163420 - 163399 | TGAATGGTTTTGACAATGTCCG |
| *spr0077* | HK08P1 | 84083 – 84104 | TAAGACCAGTGAACAGGACAAG |
| *spr0077* | HK08P4 | 85546 – 85525 | GGTAAAGGTACTTCCTAGACCG |
| *spr0579* | HK09_for | 590808 – 590781 | CAAGATAGACAACCTAGAAAGTTTGCCC |
| *spr0579* | HK09_rev | 588956 – 588983 | CGCAGAGAAGGTTGGTTTTGAAGATATG |
| *spr0529* | HK10_A_for | 527102 – 527124 | CAAAATAAATCCGAAAGCAGTGG |
| *spr0529* | HK10_A_revL1a | 528050 – 528029 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG ATAACCAGAACACTAAATATCG |
| *spr0529* | HK10_B_forL2a | 529153 – 529169 | CGACGACGACGACGACGACGA CAGTCTTTTTCTGACAATGC |
| *spr0529* | HK10_B_rev | 529991 – 529973 | AGGGCCGTGGATGTTACCG |
| *spr1815* | HK11_A_for | 1784700 – 1784722 | AGGTATTGTTCCATTCACTACCG |
| *spr1815* | HK11_A_revL1a | 1785396 – 1785374 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG GCAAGTTCGACTACCTTATAAGG |
| *spr1815* | HK11_B1_forL2a | 1786400 – 1786423 | CGACGACGACGACGACGACGA AAACCATAAAAATTAAACTGATCC |
| *spr1815* | HK11_B2_forL1a | 1786400 – 1786423 | CCGCCGCGGCAGGCCGCCGC AAACCATAAAAATTAAACTGATCC |
| *spr1815* | HK11_B_rev | 1787202 – 1787181 | CTAAGATGAAACGATGGATAGC |
| *spr2042* | Hk12_A_for | 2033103 – 2033125 | GCTATGGCGGATAAAATAGTCCG |
| *spr2042* | HK12_A_revL1a | 2034059 – 2034036 | GCGGCGGCCTGCCGCGGCGG ATTTTAGAAACAGAGATGGAAGGC |
| *spr2042* | HK12_B1_forL2a | 2035186 – 2035208 | CGACGACGACGACGACGACGA TCTGTTAGTAATGTATAAGCACC |
| *spr2042* | HK12_B2_forL2a | 2035186 – 2035208 | CCGCCGCGGCAGGCCGCCGC TCTGTTAGTAATGTATAAGCACC |
| *spr2042* | HK12_B_rev | 2036007 -2035984 | GTTATTGTGTTAGCCATTGAAGGG |
| *spr0464* | HK13_for | 471926 – 471900 | CAAAAGCACTTGAACTACCTATTCAGC |
| *spr0464* | HK13_rev | 470427 – 470450 | CAATGGTGGAAGCTGTCTGATCGC |

[1]Die angegebenen Positionsangaben beziehen sich auf die unter der GenBank-Nummer NC_003098 abgelegte *S. pneumoniae* R6-Sequenz (NCBI). Die unterstrichenen Sequenzen sind Linkersequenzen, für die die Positionsangaben nicht gelten.

**Tab. 2.9: Oligonukleotide für die RT-PCR**

| Name | Position[1] | Sequenz |
|---|---|---|
| 16sF | 15258 – 15277 | GGTGAGTAACGCGTAGGTAA |
| 16sR | 15583 – 15564 | ACGATCCGAAAACCTTCTTC |
| htrA_f_fwd | 2036788 – 2036809 | GCAAAGTAGATATTCGATTGTC |
| htrA_f_rev | 2036997 – 2036976 | GAGTGACAGTATTTGCATATTC |
| RT_931_for | 916584 – 916603 | ACCGAAATGCAGCCGTAACT |
| RT_931_rev | 916649 – 916630 | CTGGAATGGGTGCTGCTACA |

[1]Die angegebenen Positionsangaben beziehen sich auf die unter der GenBank-Nummer NC_003098 abgelegte *S. pneumoniae* R6-Sequenz (NCBI).

## 2.4 Nährmedien

### 2.4.1 CpH8 (C-Medium, nach Lacks und Hotchkiss, 1960)

*S. pneumoniae* wurde aufgrund seiner komplexen Nährstoffanforderungen für alle – sofern nicht anders spezifiziert – in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in CpH8-Medium angezogen. Die einzelnen Komponenten dieses Mediums wurden separat hergestellt und erst kurz vor Verwendung des Mediums zusammenpipettiert. Bei Bedarf wurden vor Verwendung des Mediums Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

**Zusammensetzung des CpH8-Mediums**

| Komponente | Menge [ml] |
|---|---|
| PreC | 400 |
| Supplement | 13 |
| Glutamin 1 mg/ml | 10 |
| Adams III | 10 |
| 2% Pyruvat | 5 |
| Phosphatpuffer | 15 |
| 5% Hefeextrakt | 9 |
| **Gesamtvolumen** | **462** |

**Zusammensetzung der Einzelkomponenten des CpH8-Mediums**

| **PreC** | |
|---|---|
| Na-Acetat, wasserfrei | 1,2 g |
| Casaminoacids | 5 g |
| L-Tryptophan | 5 mg |
| L-Cystein | 50 mg |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| pH 7,5 einstellen, autoklavieren | |

| **Supplement** | |
|---|---|
| 3 in 1 Salts | 60 ml |
| 20% Glukose | 120 ml |
| 50% Saccharose | 6 ml |
| Adenosin (2 mg/ml) | 120 ml |
| Uridin (2 mg/ml) | 120 ml |
| Alle Komponenten einzeln autoklavieren und steril zusammenpipettieren | |

| **Adams III** | |
|---|---|
| Adams I | 160 ml |
| Adams II | 40 ml |
| Asparagin | 2 g |
| Cholinchlorid | 0,2 g |
| 0,1 M $CaCl_2$ | 1,6 ml |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen Lagern | |

| **Phosphatpuffer, pH8** | |
|---|---|
| 1 M $KH_2PO_4$ | 53 ml |
| 1 M $K_2HPO_4$ | 947 ml |
| Puffer autoklavieren | |

| **3 in 1 Salts** | |
|---|---|
| $MgCl_2$ x 6 $H_2O$ | 100 g |
| $CaCl_2$, wasserfrei | 0,5 g |
| 0,1 M $MnSO_4$ x 4 $H_2O$ | 0,2 ml |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Lösung autoklavieren | |

| **Adams I** | |
|---|---|
| Biotin | 0,5 g |
| Nicotinsäure | 150 mg |
| Pyridoxin-HCl (Vitamin $B_6$) | 175 mg |
| Ca-Pantothenat | 600 mg |
| Thiamin-HCl | 160 mg |
| Riboflavin | 70 mg |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern | |

| **Adams II** | |
|---|---|
| $FeSO_4$ x 7 $H_2O$ | 500 mg |
| $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ | 500 mg |
| $ZnSO_4$ x 7 $H_2O$ | 500 mg |
| $MnCl_2$ x 4 $H_2O$ | 200 mg |
| $HCl_{konz.}$ | 10 ml |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern | |

### 2.4.2 Todd-Hewitt-Broth (THB)

THB ist ein für Streptokokken, Pneumokokken und andere Bakterien verbreitetes Komplexmedium, das gebrauchsfertig bezogen wurde (Bacto™ Todd-Hewitt Broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA). Das Medium wurde nach Herstellerangaben in $H_2O$ gelöst und autoklaviert. Bei Bedarf wurden vor Verwendung des Mediums Antibiotika zur Selektion zugesetzt. Der pH-Wert des autoklavierten Mediums beträgt 7,8 ± 0,2.

**Zusammensetzung des THB-Mediums**

| Komponente | Menge |
|---|---|
| Rinderherz, Aufguss von 500g | 3,1 g |
| Neopepton | 20 g |
| Dextrose | 2,0 g |
| NaCl | 2,0 g |
| $Na_2HPO_4$ | 0,4 g |
| $Na_2CO_3$ | 2,5 g |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Medium autoklavieren | |

### 2.4.3 Blutagar

Als Festmedium für *S. pneumoniae* wurde Blutagar verwendet, welcher aus D-Agar und Blut besteht. Autoklavierter D-Agar (siehe Tabelle) wurde in der Mikrowelle aufgekocht, auf 48°C im Wasserbad abgekühlt und mit 3 ml defibriniertes Schafsblut pro 100 ml versetzt. Bei Bedarf wurden Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

**Bestandteile des D-Agars**

| Komponente | Menge |
|---|---|
| Glukose | 1 g |
| Bactopepton | 10 g |
| Neopepton | 5 g |
| Hefeextrakt | 1,25 g |
| NaCl | 5 g |
| Tris | 1,25 g |
| Agar | 16 g |
| $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| Medium autoklavieren | |

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und antibakteriellen Substanzen sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

**Tab. 2.10: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika und antibakterielle Substanzen**

| Antibiotikum / Substanz | Lösungsmittel | Stammkonzentration |
|---|---|---|
| Cefotaxim | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ml |
| Piperacillin | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ml |
| Vancomycin | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ml |
| Bacitracin | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ml |
| D-Cycloserin | 0,1 M $NaPO_4^{3-}$ pH 8,0 | 50 mg/ml |
| Phosphomycin | 1M HCl | 50 mg/ml |
| Nisin (2,5%ig) | 0,05% Essigsäure | 20 mg/ml (= 500 µg/ml) |
| Gallidermin | $H_2O_{dest.}$ | 0,5 mg/ml |
| Streptomycin | $H_2O_{dest.}$ | 100 mg/ml |
| Chloramphenicol | 100 % Ethanol | 20 mg/ml |
| Spektinomycin | $H_2O_{dest.}$ | 100 mg/ml |
| Kanamycin | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ml |
| Erythromycin | 70% Ethanol | 50 mg/ml |
| Triton-X-100 | $H_2O_{dest.}$ | 10 % (w/v) |
| Desoxycholat | $H_2O_{dest.}$ | 50 mg/ ml |

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Stammkonservierung

Zur dauerhaften Konservierung der Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -80°C gelagert. Das Prinzip der Gefrierkonservierung kann als Entwässerung angesehen werden, da Wasser in Form von Eis dem Metabolismus nicht mehr zur Verfügung steht. Sie ist eine geeignete Methode die Lebensfähigkeit, die physiologische Eigenschaft, die biochemische Aktivität und die genetische Stabilität über lange Zeiträume zu erhalten. Als Gefrierschutzmittel diente Glycerin, welches als stark polare Verbindung Wasser binden und dadurch auf Makromoleküle stabilisierend wirken kann. Zur Herstellung der Glycerinkulturen wurden 200 µl Glycerin in einem Cryoröhrchen mit Schraubverschluss vorgelegt und mit 1,2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur (Nephelo zwischen 60 und 80) versetzt. Diese Mischung wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.5.2 Anzuchtbedingungen

Die Zellen wurden in 10 ml Flüssigmedium aus Glycerinkulturen oder durch Abschwemmen einer frischen Blutagarplatte angeimpft und bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Bei *S. pneumoniae* tritt nach Erreichen der stationären Phase Autolyse ein, weshalb in der Regel 10 ml CpH8-Medium am Vorabend angeimpft und in ein Eiswasserbad gestellt wurden. Der Beginn der Inkubation bei 37°C wurde mittels Zeitschaltuhr so eingestellt, dass die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase weiterbearbeitet werden konnten. Dafür wurden die Zellen 1:40 in frisches und vorgewärmtes Medium überimpft.
Zum Wachstum auf Festmedium wurden die Stämme mit einem abgeflammten Spatel aus Glycerinkulturen auf Blutagar gestrichen oder 50 µl einer Flüssigkeit ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Aufgrund der bei Pneumokokken auftretenden Autolyse wurden Einzelkolonien nach spätestens 2 Tagen in Flüssigmedium überimpft, bei 37°C inkubiert und Glycerinkulturen angelegt.
Die Messung der optischen Dichte ist bei Pneumokokken aufgrund der teilweise ausgeprägten Kettenbildung nicht sinnvoll. Man misst stattdessen die Lichtstreuung (Nephelometrie) der Zellen. Dies ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Licht, welches infolge der Wechselwirkung mit festen Teilchen, deren Durchmesser im Vergleich zur Wellenlänge groß

ist, eine vom primären Lichtstrahl abweichende Ausbreitungsrichtung besitzt (Tyndall-Effekt). Dieses (irreführend) häufig auch als Streulicht bezeichnete Licht entsteht hauptsächlich durch Reflexion an und Brechung in den Teilchen, die in einer flüssigen Suspension gleichmäßig verteilt sind. Die Intensität dieses sogenannten Streulichtes, das meist im rechten Winkel zur Primärstrahlrichtung mit einem Photodetektor gemessen wird, ist in erster Näherung proportional zur 2. Potenz der Teilchendurchmesser und nahezu unabhängig von der Frequenz des Lichtes (im Gegensatz zur Streulichtmessung an Teilchen in der Größenordnung der Wellenlänge). Zwischen der Intensität des so genannten Streulichtes und der Zahl der Mikroorganismen pro Volumeneinheit des Kultivierungsmediums besteht ein linearer Zusammenhang, solange die Zellen sich nicht gegenseitig beschatten. Dies gilt im Allgemeinen bis zu einer Zellkonzentration von $10^8$ Zellen/ml.
Für Wachstumskurven wurden 10 ml vorgewärmtes Flüssigmedium 1:40 aus einer frischen, sich in der Log-Phase befindenden Übernachtkultur beimpft. Die Messung erfolgte im Nephelometer (Diffusion Systems, London, England). Nach halblogarithmischer Darstellung der Messwerte erfolgte die Bestimmung der Wachstumsrate bzw. Generationszeit µ durch Darstellung einer Regressionsgrade durch den linearen Bereich der Wachstumskurve (exponentielles Wachstum der Kultur). Anschließend wurde anhand der Regressionsgraden die Verdoppelungszeit aus einer Graphik abgelesen. Die Regressionsgrade wurde mit der Software Microcal™ Origin™ erstellt.
Für Experimente zur Induktion der Zelllyse wurde zu einer logarithmisch wachsenden Kultur bei Nephelo 20 das Antibiotikum oder die Substanz dazugegeben und das weitere Wachstum verfolgt.

### 2.5.3 Mikroskopische Analyse von Zellen

Morphologische Aberrationen und Verunreinigungen einer Bakterienkultur können mit Hilfe eines Mikroskops angezeigt werden. Hierzu wurden 15 µl einer wachsenden Bakterienkultur bei ca. N20 – N50 entnommen, auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen überschichtet. Mit einem Präzisionswischtuch wurde auf das Deckgläschen gedrückt, um den Flüssigkeitsfilm zwischen Objektträger und Deckgläschen zu minimieren. Die 40 x-Vergrößerung des Mikroskops wurde benutzt, um die Fokussierungsebene einzustellen. Mit dem Immersionsöl-100x-Objektiv wurden die Zellen betrachtet und eventuell mit der CCD-1300B-Kamera photographiert.

### 2.5.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Unter der MHK versteht man die Mindestkonzentration eines bestimmten Antibiotikums, bei der kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden kann. Die Bestimmung erfolgte auf Blutagarplatten, denen direkt vor dem Gießen der Platten die entsprechende Menge des zu testenden Antibiotikums zugesetzt wurde.
Die zu untersuchenden Bakterien wurden aus der Glycerinkultur mit einem Spatel herausgekratzt und in 300 µl CpH8-Medium resuspendiert, kurz bei 37°C inkubiert und mit einer Impföse auf eine Fläche von ca. 1 $cm^2$ verteilt. Die Platten wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Hierbei gibt der 24-Stunden-Wert die MHK an. Nach weiteren 24 Stunden wurden eventuelle Abweichungen kontrolliert.

## 2.6 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Präparation von natürlich kompetenten Zellen wurde *S. pneumoniae* 1:40 aus einer logarithmisch wachsenden Übernachtkultur in vorgewärmtes CpH8-Medium mit Zusatz von BSA (Endkonzentration = 0,08%) angeimpft und bei 37°C inkubiert. Ab einer Zelldichte von N = 15 wurden 180 µl Suspension mit 20 µl Glycerin versetzt, gründlich gevortext, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 20 µl einer auf Eis aufgetauten Glycerinkultur kompetenter Zellen mit 180 µl auf 30°C vorgewärmtes CpH8-Medium, welches 0,08% BSA enthielt, gemischt. Nach Zugabe von 10 – 1000 ng zu transformierender DNA wurden die Zellen 30 Minuten bei 30°C (zur DNA-Aufnahme und Rekombination) und danach weitere 2 Stunden bei 37°C (zur phänotypischen Expression der Resistenz) im Wasserbad inkubiert. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine Blutagarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Die Inkubation der Blutagarplatten erfolgte bei 37°C.
Zur Transformation nicht-kompetenter Labormutanten wurden die Zellen, wie oben beschrieben, präpariert und transformiert, wobei dem Transformationsansatz noch zur Komplementation synthetisches CSP (**c**ompetence **s**timulating **p**eptide) zugesetzt wurde (Endkonzentration im Transformationsansatz: 100 ng/ml).
Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde eine Kultur wie unter 2.5.2 beschrieben kultiviert. Dabei wurden der wachsenden Kultur ab N = 10 bis zum Erreichen der stationären Phase alle 30 min bzw. zu bestimmten Nephelo-Werten Aliquots entnommen und, nach Zugabe von Glycerin in einer Endkonzentration von 10%, schockgefroren. Diese Proben wurden anschließend parallel transformiert. Als Standard diente chromosomale DNA aus dem *S. pneumoniae* Stamm AmiA9 ($Str^R$; Salles *et al.*, 1992; Sicard, 1964; Selektion bei 200 µg/ml Streptomycin).
In Abwandlung des oben wiedergegebenen Protokolls wurde die phänotypische Expression im Festmedium durchgeführt. Zusätzlich wurde mit DNase I die Transformation abgebrochen. Um eine Verfälschung der Effizienzbestimmung durch sich teilende Zellen zu vermeiden, wurde die Überschichtungstechnik angewandt: Nach Zugabe von 1 µl DNase I (10 mg/ml) in die Petrischalen wurden geeignete Verdünnungen der Transformationsansätze zu der DNase I in die Petrischalen gegeben und mit 10 ml bzw. bei Verwendung von kleinen Petrischalen (Ø = 5 cm) 5 ml auf 48°C abgekühltem Blutagar ohne Streptomycin eingegossen. Die phänotypische Expression erfolgte dann 2 Stunden bei 37°C im Festmedium. Anschließend wurde ein Teil der Platten zur Bestimmung der Transformantenzahl mit 10 ml bzw. 5 ml D-Agar ohne Blut mit 400 µg/ml Streptomycin überschichtet, während höhere Verdünnungen ($10^{-4}$ und/oder $10^{-5}$) des Transformationsansatzes zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (CFU = colony forming units) mit 10 ml bzw. 5 ml D-Agar ohne Blut und ohne Antibiotikum überschichtet wurden. Die Transformationseffizienz ergibt sich nach Auszählen geeigneter Verdünnungen als prozentualer Wert aus der Zahl der Transformanten, geteilt durch die Lebendkeimzahl bezogen auf 1 ml Kulturvolumen.

**Lösungen und Reagenzien für die Transformation von *S. pneumoniae* R6**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| BSA | 8% in $H_2O$, sterilfiltriert |
| CSP | 10 µg/ml in Wasser |
| DNase I | 10 mg/ml in 20 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % Glycerol |

## 2.7 Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren

### 2.7.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Präparation von genomischer DNA aus *S. pneumoniae* basiert auf einer Methode nach Marmur (Marmur, 1961). Für die Präparation wurden ca. 10 ml einer Kultur von *S. pneumoniae* bei Nephelo 70 – 90 abzentrifugiert (15 ml Greiner-Röhrchen, 2 Minuten, 10000 x g, 4°C, zur Umrechnung von g in rpm wurde die Formel $xg = 1{,}12 * 10^{-5} rpm^2 * r$ benutzt, r = Radius in cm), das Pellet bei RT in 360 µl 5 x TE durch Vortexen resuspendiert und in ein Eppendorf Reagenzgefäß (ERG) überführt. Nach Zugabe von 40 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) wurden die Zellen kurz gemischt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur induzierten Autolyse der Zellen wurden diese mit 400 µl 2% SDS-Lösung versetzt, invertiert und ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die eintretende Lyse der Zellen beobachtet. Sofort nach vollständiger Lyse der Zellen wurden zur Entfernung der Proteine 200 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Suspension für 30 Minuten im Eppendorf-Schüttler geschüttelt. Schließlich konnte nach 5 minütiger Zentrifugation (12000 x g, RT) die Oberphase in ein neues ERG überführt werden und nochmals mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol für 20 Minuten ausgeschüttelt werden. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die erhaltene Oberphase mit einem Volumen 2-Propanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,1) versetzt, invertiert, für 10 Minuten bei RT stehen gelassen und 5 Minuten bei 12000 x g abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde die DNA vorsichtig im Exsikkator getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl 1 x TE für eine Stunde bei 37°C gelöst.

Alternativ wurde zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* der Wizard® Genomic DNA Purification Kit von Promega benutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Vermeidung des giftigen Phenols und der kürzeren Arbeitszeit. Die Benutzung erfolgte in Anlehnung an Protokoll G des Herstellers. Dabei wurden 10 ml *S. pneumoniae* Kultur (Nephelo zwischen 70 und 90) in 200 µl 50 mM EDTA + 0,1 % DOC gelöst und auf zwei ERGs aufgeteilt. Durch Zugabe von 200 µl 50 mM EDTA und 300 µl „Nuclei Lysis Solution“ zu jedem Tube sowie nach gründlichem Mischen und Inkubation bei 80°C für 10 Minuten wurden die Zellen lysiert. Nach der Zugabe von 1,5 µl RNase A (10 mg/ml) wurden die Zelllysate für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf RT abgekühlt, 100 µl „Protein Precipitation Solution“ zugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 x g wurde in ein neues ERG überführt und mit 600 µl Isopropanol gemischt. Die DNA war als weiße Wolke sichtbar. Diese wurde durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 x g präzipitiert. Gereinigt wurde die DNA mit zweimal 600 µl 70% Ethanol. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 x g wurde der Überstand entfernt und das Pellet vorsichtig in der SpeedVac (Trocknungsrate: hoch) für 5 – 10 Minuten getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl 1 x TE-Puffer oder $H_2O$ für 1 Stunde bei 37°C gelöst.

**Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* R6**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 5 x TE | 50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA |
| RNase A | 10 mg/ml in 1 x TE gelöst (10 min bei 96°C gekocht zur DNase Inaktivierung) |
| 2 % SDS | 2 g SDS in 100 ml Wasser |
| Proteinase K | 20 mg/ml in Tris-HCl pH 7,4, 1 mM $CaCl_2$, 50% Glycerol |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol | 25:24:1-Mischung |
| 2-Propanol | p.A. |
| 3 M NaAc pH 5,1 | 24,612 g in 100 ml Wasser, mit 5 M HCl pH eingestellt |
| 70% Ethanol | p.A., in Wasser |
| 1 x TE | 10 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA |
| 50 mM EDTA, 0,1 % DOC | 0,1 g Na-Desoxycholat, 1,46 g EDTA in 100 ml Wasser |

### 2.7.2 Präzipitation von DNA

Zu der DNA-enthaltenden Lösung wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,1) und 2 Volumen Ethanol (100%, p.A., -20°C) bzw. 1 Volumen 2-Propanol (100%, p.A., -20°C) zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz zum quantitativen Fällen der DNA mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 4°C, 13000 x g) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet einmal mit Ethanol (70%) gewaschen. Nach vollständigem Abheben des Überstandes wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet und anschließend in 1 x TE oder in $H_2O$ gelöst.
Bei geringer DNA-Konzentration kann dem Ansatz als Fällhilfe (vor Zugabe von Natriumacetat und Alkohol) 1 µl Glycogen-Lösung zugesetzt werden.

**Lösungen zur Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 3 M NaAc pH 5,1 | 24,612 g in 100 ml Wasser, mit 5 M HCl pH eingestellt |
| 70 % Ethanol | p.A., in Wasser |
| 1 x TE | 10 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA |
| Glykogen | 35 mg/ml in $H_2O$ |

### 2.7.3 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient dem Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen. Bei geringen Volumina wurde der Ansatz zunächst mit $H_2O$ auf 100 µl aufgefüllt. Daraufhin wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gründlich gemischt und der Ansatz abzentrifugiert (5 Minuten, 12000 x g, RT). Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgehoben, in ein neues ERG überführt und erneut extrahiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die Interphase klar war. Anschließend wurde eine Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Aus diesem Überstand wurde nach diesem Extraktionsschritt die gereinigte DNA durch Präzipitation gewonnen (siehe 2.7.2).

### 2.7.4 DNA-Elution aus Agarosegelen

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten nach der Auftrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwendet. Diese Aufreinigungsmethode beruht auf der Herauslösung der DNA aus der Agarose durch chaotrope Salze (z.B. Thiocyanat- oder Iodidanionen), welche die Struktur von Wasser modifizieren. Die Bindung von DNA an eine Membran aus beschichtetem Silika-Gel in Anwesenheit eines hochsalzigen Bindepuffers ist sehr stark pH-abhängig und geschieht oberhalb von pH 7,5. Nach einer Reihe von Waschschritten zur Entfernung von Verunreinigungen kann die DNA mit niedrigsalzigen Lösungen wie TE-Puffer bei pH < 7,5 eluiert werden.
Die Agarosestücke, welche die DNA-Fragmente enthalten, wurden für 10 Minuten bei 50°C in 3 x Volumen Puffer QG gelöst. Diese Lösung wurde auf eine Säule gegeben und für 1 Minute zentrifugiert (10000 x g). Nicht gebundenes Material wurde von der Säule mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt (13000 x g, 1 Minute) getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen. Die DNA wurde mit 50 µl 60°C warmem EB-Puffer eluiert.

### 2.7.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion diente der Jet Quick PCR Purification Spin Kit (Genomed, Löhne). Das Prinzip der DNA-Bindung ist das gleiche wie bei dem QIAquick Gel Extraction Kit (siehe 2.7.4). Diese Methode wurde nach Angaben des Herstellers benutzt.

### 2.7.6 Quantifizierung von DNA

Zur Ermittlung der Konzentration von DNA in Lösung wurde die spektralphotometrische Lichtabsorptionsmessung des NanoDrops angewendet. Hierbei wird der Bruchteil des eingestrahlten Lichts, der von einer Lösung bei gegebener Wellenlänge absorbiert wird, gemessen. Dieser ist abhängig von der Strecke, die der Lichtstrahl im absorbierenden Medium zurücklegen muss und von der Konzentration der Substanz (hier DNA). Diese zwei Beziehungen werden im Lambert-Beer-Gesetz zusammengefasst, das in der integrierten Form folgendermaßen formuliert wird:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

$E$ ist die Extinktion, $I_0$ die Intensität des einfallenden Lichts und $I$ die Lichtintensität, die nach dem Durchgang durch die Probe gemessen wird. Mit $\varepsilon$ wird der molare Absorptionskoeffizient (Einheit L $mol^{-1}$ $cm^{-1}$) bezeichnet, mit $c$ die Konzentration der absorbierenden Moleküle (in mol $L^{-1}$), und $l$ ist die Länge, die das Licht im absorbierenden Medium zurücklegen muss (in cm). Der molare Absorptionskoeffizient ist abhängig von der Art der absorbierenden Substanz, dem Lösungsmittel, der Wellenlänge des einstrahlenden Lichts und gegebenenfalls auch vom pH-Wert der Lösung.
Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht 50 µg pro ml doppelsträngiger DNA. Als Referenz wurde das jeweilige Lösungsmittel benutzt. Um die Reinheit der DNA zu quantifizieren wurde das $E_{260}$ / $E_{280}$ und das $E_{260}$ / $E_{230}$ Verhältnis benutzt. Ein $E_{260}$ / $E_{280}$ Verhältnis von 1,8 – 1,9 indiziert einen hohen Reinheitsgrad der DNA. Kontaminationen, die bei 280 nm absorbieren (z.B. Proteine und Peptide aufgrund der aromatischen Aminosäuren) reduzieren dieses Verhältnis. Das $E_{260}$ / $E_{230}$ Verhältnis ist ein Indikator für Kontaminationen, die bei 230 nm absorbieren, z.B. Proteine (Peptidbindung) oder Phenol. Ein Verhältnis oberhalb von 2 deutet einen hohen Reinheitsgrad der DNA an.

### 2.7.7 Präparation von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

**Allgemeine Bemerkungen zum Umgang mit RNA**
Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden alle Arbeitsschritte, an denen RNA beteiligt war, mit Handschuhen durchgeführt. Alle Puffer und Reagenzien wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt (Sambrock *et al.*, 1989) und autoklaviert. Oberflächen von Glaswaren und Gerätschaften (Agarose-Gelelektrophorese, SpeedVac), die mit RNA in Kontakt kommen könnten, wurden mit RNaseZAP vorbehandelt und mit RNase-freiem Wasser nachgewaschen. Glaswaren wie z.B. Pipetten wurden 2-fach bei 200°C gebacken und für die RNA-Präparation ein gesonderter Pipettensatz benutzt. Außerdem wurden gestopfte Spitzen verwendet. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert, da die RNA aufgrund der 2´-Hydroxylgruppe eine erhöhte Anfälligkeit für hydrolytischen Abbau besitzt (besonders in alkalischen Lösungen oder in Anwesenheit von Lewis-Säuren).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur RNA-Isolation beruht auf der `Heißen Phenol Methode´ (Maes und Messens, 1992). Sie führt zu einer Ausbeute von rund 600 µg Gesamt-RNA aus 100 ml Kultur (bei einer Zelldichte von Nephelo = 40).

**Gewinnung der Zellen zur Präparation**
20 ml auf 37°C vorgewärmtes Flüssigmedium (CpH8 bzw. THB) wurden 1:40 aus einer frischen Übernachtkultur von *S. pneumoniae* beimpft und bei 37°C im Wasserbad bis zu einer Zelldichte von N = 60 inkubiert. Hiervon wurde weiteres auf 37°C vorgewärmtes Flüssigmedium (500 ml) im Verhältnis 1:40 beimpft und bis zur gewünschten Zelldichte bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Diese Kultur wurde durch Zentrifugation bei 37°C (zur Vermeidung der Induktion von Kälteschockgenen) geerntet (10000 x g, 2 Minuten). Dabei wurde das Volumen so angepasst, dass immer ca. $1*10^{10}$ Zellen geerntet wurden (N40 ~ $1*10^{8}$ Zellen/ml). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

**Vorbereitung des Phenols**
30 ml Phenol/Wasser und 5 ml Chloroform wurden gemischt und die Suspension wurde bis zur vollständigen Klärung stehengelassen. Alternativ kann auch Acid Phenol/Chloroform verwendet werden. 25 ml dieser Phenol/Chloroform-Lösung wurden mit 25 ml NAE-Puffer gemischt und diese Gebrauchslösung bis zur vollständigen Phasentrennung im Kühlschrank ruhen gelassen. Eine entsprechende Menge NAE-gesättigten Phenols wurde rechtzeitig vor Beginn der Extraktion auf 60°C vorgewärmt.

**Isolierung der Gesamt-RNA**
4 ml heißes Phenol (60°C) wurde im Zentrifugenbecher zu dem gefrorenen Zellpellet von 100 ml Zellen gegeben. Nach zügigem Resuspendieren des Pellets und gründlichem Mischen wurde die Suspension für 5 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. 4 ml auf 60°C vorgewärmter NAES-Puffer wurden zu der Suspension pipettiert, gründlich gemischt und weitere 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (10000 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde in heavy „Phase Lock Gel™“-Röhrchen (Murphy und Hellwig, 1996) überführt. In diesen Röhrchen wurden zwei weitere Phenolextraktionen mit Phenol/Chloroform (1:1) bei RT durchgeführt (1500 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde schließlich in 15-ml-Falcon-Tubes überführt, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,1) und einem Volumen 2-Propanol versetzt und invertiert. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20°C über Nacht.

Die ausgefällte RNA wurde durch Zentrifugation (10000 x g, 30 Minuten) gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (ohne Zentrifugation). Nach vollständigem Abheben des Überstandes wurde das Pellet im Exsikkator für 15 Minuten getrocknet und schließlich in 888 µl RNase-freiem $H_2O$ gelöst.

**DNase-Behandlung**
Um die RNA von der DNA zu trennen wurde die DNA zunächst durch DNase I verdaut. Als RNase-Protektions-Reagenz diente RNasin, ein 50 kDa großes Protein, welches durch nicht kovalente Bindung (Bindungsverhältnis 1:1) unterschiedliche RNasen (RNase A, B, C, menschliche plazentale RNase und Angiogenin) inhibieren kann. Die DNase-Behandlung wurde wie folgt durchgeführt:

| | |
|---|---|
| 888 µl | RNA-Lösung |
| 100 µl | 10x MBI DNase-Puffer |
| 10 µl | RNase-freie DNase I (MBI) |
| 2 µl | RNasin (Promega) |

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

### 2.7.8 Reinigung von RNA
Die nach dem DNase-Verdau erhaltene Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Cleanup Protokolls des „RNeasy® Midi“ Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Bindung der RNA an die Säulenmatrix wurde durch Inkubation des Lösungsvolumens und der Säule auf Eis favorisiert. Die Elution der RNA von der Matrix wurde zweimal mit 200 µl 65°C warmem RNase-freiem $H_2O$ durchgeführt.

### 2.7.9 Qualitätsüberprüfung der RNA
Zur Auftrennung von RNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese (modifiziert nach RNeasy® Midi Handbook, Qiagen, Hilden) angewandt. Das Auftrennungsvermögen hängt mit der Agarosekonzentration zusammen, die für RNA mit 1% gewählt wurde. Für die Herstellung des Agarose-Gels wurden zu einer auf 65°C temperierten 1%igen Agarose-Lösung 1,8% Formaldehyl (37% = 12,3 M) gegeben, gemischt und in der mit RNaseZAP gereinigten Elektrophoresekammer unter dem „Abzug“ zum Erhärten gebracht. Die RNA wurde in diesem Formaldehyd-Agarose-Gel in 1 x TEE-Puffer bei 10 V pro cm Gellänge aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die „RNA Ladder High Range ready-to-use“ von MBI Fermentas verwendet.

### 2.7.10 Quantifizierung der RNA
1 µl der präparierten RNA-Lösung wurde ohne Verdünnung im NanoDrop spektralphotometrisch quantifiziert. Als Referenz diente das RNase-freie $H_2O$ aus dem RNeasy® Midi Kit. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht hierbei 40 µg einzelsträngiger RNA pro ml. Der Reinheitsgrad der RNA wurde mit den Verhältnissen von $E_{260}$ / $E_{280}$ und $E_{260}$ / $E_{230}$ gemessen. Ein $E_{260}$ / $E_{280}$ Verhältnis von 2 und ein $E_{260}$ / $E_{230}$ Verhältnis oberhalb von 2 deuten einen hohen Reinheitsgrad der RNA an.

**Lösungen und Reagenzien für die Isolierung von Gesamt-RNA**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| DEPC-Wasser | 0,1 % DEPC in Wasser, über Nacht gerührt, autoklaviert |
| Phenol-Chloroform-Lösung | 5:1 Phenol-Chloroform, mit NAE gesättigt |
| NAE-Puffer | Natriumacetat (50 mM, pH 5,1), EDTA (10 mM) |
| NAES-Puffer | Natriumacetat (50 mM, pH 5,1), EDTA (10 mM), 1% SDS |
| 3 M NaAc pH 5,1 | 24,612 g in 100 ml Wasser, mit 5 M HCl pH eingestellt |
| 70% Ethanol | p.A., in Wasser |
| MBI-DNase-Puffer | 100 mM Tris-HCl, 25 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ pH 7,5 |
| DNase I, RNase-frei | 5 Units/µl |
| RNasin | 40 Units/µl |
| TEE-Puffer | 40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA (aus 50 x TEE) |
| 1% Agarose | 1 g SeaKem LE Agarose in 100 ml TEE-Puffer aufgekocht |

## 2.8 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Mit Hilfe der PCR können DNA-Fragmente gezielt amplifiziert werden (Saiki, 1988). Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt.
Die PCR setzt sich aus drei verschiedenen temperaturabhängigen Schritten zusammen. Durch hohe Temperatur wird die Template-DNA im ersten Schritt aufgeschmolzen, so dass sich die beiden Stränge voneinander trennen (Denaturierung). Durch Absenkung der Temperatur im zweiten Schritt wird die Anlagerung der Primer an ihre komplementären Sequenzen erreicht. Die gewählte Anlagerungs-Temperatur wird durch den GC-Gehalt der verwendeten Primer, deren Länge sowie durch die Konzentration monovalenter Kationen bestimmt, weshalb sie für jeden Primer neu berechnet werden muss. Folgende Formel wurde für die Berechnung der Anlagerungs-Temperatur benutzt (modifiziert nach Newton und Graham, 1994):

$$T_A = T_M - 5°C; T_M = 81{,}5 - 16{,}6 * \log_{10}[Na^+] + 41 * \left(\frac{\#G+\#C}{\#A+\#C+\#G+\#T}\right) - \frac{500}{\#A+\#C+\#G+\#T}$$

Hierbei ist $T_A$ = Anlagerungs-Temperatur, $T_M$ = Schmelztemperatur der DNA, bei der 50% der Moleküle als Doppelstrang vorliegen, # = Anzahl Basen im Primer. Die $[Na^+]$-Konzentration wurde mit 0,1 M angenommen. Weiterhin wurde der „Oligonucleotide Properties Calculator“ (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) zur Berechnung von Haarnadel-strukturen und Bindung des Primers an sich selbst benutzt.
Im dritten Schritt werden die eingesetzten Primer in Richtung 3’-Ende verlängert. Dem 3’-Ende der Primer kommt dabei eine größere Wichtigkeit zu, da ohne eine korrekte Bindung dieses 3’-Endes keine Verlängerung stattfinden kann. Auf diese Weise wird ein zur Template-DNA komplementärer neuer DNA-Strang synthetisiert (Verlängerung). Die Verlängerungszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments sowie von der Syntheseleistung der Polymerase ab. Allgemein reicht für die Amplifikation eines ein Kilobasen großen Fragments eine Elongationszeit von 1 Minute aus.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde je nach Verwendungszweck der PCR-Produkte mit verschiedenen Polymerasen gearbeitet. Die Goldstar-Polymerase hat keine Proofreadingaktivität und wurde z.B. zur Überprüfung von Stämmen benutzt. Die Pfu-Polymerase kann ihre eigenen Fehler korrigieren und wurde dementsprechend für Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet.

**Verwendete DNA-abhängige DNA-Polymerasen**

| | Goldstar-Polymerase | Pfu-Polymerase |
|---|---|---|
| Hersteller | Eurogentec | Stratagene |
| Herkunft | *Thermus sp.* | *Pyrococcus furiosus* |
| Gewinnung | Gentechnisch | natürlich |
| Halbwertszeit | > 40 min | > 120 min |
| 5'→ 3' Exonuklease | Vorhanden | nicht vorhanden |
| 3'→ 5' Exonuklease | nicht vorhanden | vorhanden |
| Produktenden | 3'A-Überhang | blunt end |

Als Template wurde chromosomale DNA oder Zellysat (siehe 2.8.1) von *S. pneumoniae* eingesetzt. Die DNA-Menge variierte zwischen 10 und 100 ng.

**Zusammensetzung von PCR-Ansätzen für die Goldstar-Polymerase**

| Komponente | Menge für 100 µl Ansatz |
|---|---|
| 10x Goldstar-Puffer | 10 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1 µl |
| $MgCl_2$ (25 mM) | 10 µl |
| Primer 1 (10 µM) | 1 µl |
| Primer 2 (10 µM) | 1 µl |
| Template-DNA (10 – 100 ng) | X µl |
| Goldstar-Polymerase (2,5 Units/µl) | 0,5 µl |
| $H_2O$ | *ad* 100 µl |

**Zusammensetzung von PCR-Ansätzen für die Pfu-Polymerase**

| Komponente | Menge für 100 µl Ansatz |
|---|---|
| 10x Pfu-Puffer | 10 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1 µl |
| Primer 1 (10 µM) | 1 µl |
| Primer 2 (10 µM) | 1 µl |
| Template-DNA (10 – 100 ng) | X µl |
| Pfu-Polymerase (0,25 Units/µl) | 1 µl |
| $H_2O$ | *ad* 100 µl |

Zur Amplifikation der DNA-Fragmente wurde ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel verwendet. Dieser wurde wie in folgender Tabelle programmiert.

**Zeit- und Temperaturangaben für eine PCR**

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Wiederholungen |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 96 | 2 | |
| Denaturierung | 96 | 0,5 | 30x |
| Anlagerung | X | 0,5 | |
| Verlängerung | 72 | 1 pro kb | |
| Verlängerung | 72 | 5 | |
| Kühlung | 4 | ∞ | |

Die Schritte 2 bis 4 stellen einen Zyklus dar und wurden 30 x wiederholt. Der initiale Denaturierungsschritt gewährleistet eine vollständige Trennung der Einzelstränge, die finale Verlängerung stellt eine Vervollständigung angefangener DNA-Stränge sicher.
Bei der Verwendung der Pfu-Polymerase wurde die so genannte „hot start"-Methode angewandt. Dabei wurde die Polymerase erst nach dem Erreichen des ersten Anlagerung-Schrittes zugegeben. Auf diese Weise wird der Abbau von ssDNA-Matrize und Oligonukleotiden durch die 3'→ 5' –Exonuklease-Aktivität vermieden (Newton und Graham, 1994).

### 2.8.1 Direkte PCR aus Flüssig-/Glycerinkultur

100 µl Kultur (Glycerinkultur oder Zellen bei Nephelo ~ 60) wurden für 2 Minuten bei 12000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 µl 10% Triton-X-100 resuspendiert. Die Lyse erfolgte für eine Minute im Wasserbad bei 37°C. Der Ansatz wurde anschließend 5 Minuten bei 96°C erhitzt, um DNasen zu inaktivieren. 1 µl dieses Ansatzes wurde als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt.

**Lösungen und Reagenzien für die PCR**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| dNTPs | dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM |
| Triton X-100 | 10%ige Lösung |
| $MgCl_2$ | 25 mM |
| Goldstar-Enzym/-Puffer | 2,5 Units/µl |
| Pfu-Enzym/-Puffer | 2,5 Units/µl |

### 2.8.2 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR (Reverse-Transcriptase-PCR) lassen sich spezifisch einzelne RNA-Fragmente nachweisen. Im Vergleich zu anderen RNA-Nachweisverfahren z.B. Northern-Blot-Analyse ist die Sensitivität der RT-PCR wesentlich größer. Im Vergleich zu einem Referenztranskript lassen sich auch verschiedene Proben direkt quantitativ miteinander vergleichen.
Bei der RT-PCR erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese durch die Reverse Transkriptase mit RNA als Matrize. Darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. In dieser cDNA-Synthesereaktion können unterschiedliche Primer zum Einsatz kommen: Oligo(dT)-Primer, random Hexamere und sequenzspezifische Primer. Die Auswahl der Primer ist spezifisch für die Art der Probe bzw. richtet sich nach dem Experiment. In den hier gezeigten Experimenten wurden random Hexamere eingesetzt. Diese sind Hexanukleotide mit einer zufälligen Basenzusammensetzung, die entsprechend ihrer individuellen Sequenz an den verschiedensten Stellen eines RNA-Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der RNA einleiten können. Von Vorteil ist eine Erststrangsynthese mit random Hexameren immer dann, wenn Sekundärstrukturen innerhalb der Matrizen-RNA eine Amplifikation von einer definierten Startstelle aus verhindern oder ein Sequenzverlust am 5'-Ende, der häufig durch einen vorzeitigen Abbruch der Polymerasereaktion bei einer am 3'-Ende der mRNA beginnenden cDNA-Synthese entsteht, vermieden werden soll.
Zur Isolierung der RNA wurden 10 ml Bakterienkultur 2 Minuten bei 10000 x g abzentrifugiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die weitere Präparation ist analog zu der in Kapitel 2.7.7 beschriebenen Methode durchgeführt worden, allerdings aufgrund der geringeren Zellmenge mit einem Drittel der dort angegebenen Volumina. Die Aufreinigung der RNA erfolgte über RNeasy® Mini-Säulen nach Angaben des Herstellers.

750 ng gereinigte RNA wurden mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR nach Angaben des Herstellers (Roche) in cDNA umgeschrieben und anschließend 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.
5 µl dieser cDNA wurden in einer RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit 10 pmol Oligonukleotiden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde in einer LightCycler® Kapillare für 15 Sekunden bei 735 x g zentrifugiert und in den LightCycler® 2.0 Thermocycler geladen. Die Thermocycler-Konditionen waren wie folgt: 10 Minuten bei 95°C für die Aktivierung der Polymerase, 45 Zyklen von 10 s 96°C, 10 s 54°C und 20 s 72°C. Die SYBR Green Fluoreszenz wurde am Ende eines jeden Zyklus gemessen. Die Schmelzkurvenanalyse wurde im Anschluss an die PCR mit folgenden Konditionen durchgeführt: die Temperatur wurde auf 65°C reduziert und mit 0,1°C $s^{-1}$ auf 95°C erhöht. Die SYBR Green Fluoreszenz wurde kontinuierlich während der Schmelzkurvenanalyse gemessen.
Als Ergebnis einer RT-PCR-Messung erhält man einen Cp-Wert, welcher als der Wert definiert ist, bei dem das Fluoreszenzsignal eine bestimmte Detektionsgrenze überschreitet. Dieser Wert wurde automatisch von der LightCycler Software 4.0 berechnet. Ein geringerer Cp-Wert bedeutet eine höhere Konzentration der gemessenen cDNA, da das Fluoreszenzsignal früher detektiert werden kann. Die Cp-Werte der zu vergleichenden cDNAs werden gegen ein 16S-rRNA-spezifisches RT-PCR-Produkt normalisiert. So wird gewährleistet, dass Cp-Unterschiede nur durch unterschiedliche Transkriptkonzentrationen und nicht durch Variationen in der Gesamt-RNA-Konzentration gemessen werden. Jede Messung wurde in einem Duplikat durchgeführt und der Mittelwert wurde zur Berechnung des Cp-Unterschiedes benutzt. Dieser Unterschied wurde zur Basis von 2 logarithmiert, da theoretisch jeder Zyklus eine Verdopplung des RT-PCR-Produktes darstellt. Dieser logarithmierte Cp-Unterschied stellt das Ratio der cDNA-Konzentrationen dar. Die Experimente wurden mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Die Schmelzkurven enthalten Informationen zu den generierten Produkten und können Mischprodukte andeuten.

## 2.9 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Generell wirkt auf ein Molekül mit der Ladung q in einem elektrischen Feld E eine Kraft. Es gilt: $F = q * E$ [Newton]. Da sich das Molekül in einer Umgebung der Viskosität $\eta_0$ befindet, wirkt eine Reibungskraft $F_f$ seiner Bewegung entgegen. Nukleinsäuren sind aufgrund der Phosphatreste negativ geladen (Ladung q) und können wie jedes andere geladene Makromolekül elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wanderungs-geschwindigkeit der Moleküle ist von der Größe, Konformation und der Agarose-konzentration (Viskosität $\eta_0$) abhängig. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen (vor allem *Gelidium*- und *Gracillaria*-Arten) hergestellt. Bei einem 1%igen (w/v) Agarosegel entstehen Porengrößen von ca. 150 nm, mit denen sich DNA-Fragmente von 0,5 – 6 kb auftrennen lassen. Bei größeren DNA-Fragmenten entsteht die sogenannte limitierte Beweglichkeit, bei der sich Moleküle durch die Gelporen hindurchzwängen müssen, wodurch der eigentliche Siebeffekt des Gelsystems verloren geht.
Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1 x TEE-Puffer vollständig gelöst und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Anschließend wurden durch Einsatz eines Kammes die Vertiefungen im Agarosegel hergestellt. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Gel in die Elektrophoresekammer direkt in den Puffer gelegt, wodurch ein sogenanntes „Submarine"-Gel entsteht. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Das Glycerin erhöht die Dichte der DNA-Lösung und lässt die DNA-Probe in die Geltaschen absinken. Der Farbstoff

Bromphenolblau dient als Indikator für die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld und hat ungefähr das gleiche Laufverhalten wie ein 700 bp langes doppelsträngiges, lineares DNA-Molekül. Für die analytische Auftrennung wurde die DNA oder RNA bei 10 V pro cm Länge des Agarosegels elektrophoretisiert. Nach dem Lauf wurden die Moleküle mit dem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt, wodurch sie im UV-Licht eines Transilluminators bei 254 nm für analytische bzw. 365 nm für präparative Zwecke als fluorezierende Banden sichtbar wurden und mit einer Geldokumentationsanlage aufgezeichnet werden konnten.
Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearisierter DNA in einem elektrischen Feld ist umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus des Molekulargewichts. Die Größe unbekannter DNA-Fragmente kann daher durch Vergleich mit definierten Fragmenten eines DNA-Längenmarkers bestimmt werden. Als Längenstandard wurde der GeneRuler™ 1 kb Ladder von MBI Fermentas verwendet. Dieser enthält Fragmentgrößen von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 Basenpaaren.

**Mikroagarosegele**

Die Mikrogeltechnik ist eine Form der Gelelektrophorese, modifiziert nach Lage *et al.* (2002). Sie basiert auf dem Objektträgerformat (76 x 26 mm), welches auch von dem Biochip-Scanner gelesen werden kann. Hierzu wurde ein für normale Agarosegele benutzbarer Kamm auf einen Objektträger gestellt und mit zwei Klammern so befestigt, dass der Kamm von alleine stand. Das Gel wurde durch eine 2%ige Agaroselösung hergestellt, die auf einen Objektträger aufgetragen wurde, so dass dieser ca. drei Millimeter mit einem Gel bedeckt war. Nach der vollständigen Erhärtung der Agaroselösung (ca. 10 Minuten) konnte das Gel mit dem Objektträger in eine normale Gelelektrophoresekammer überführt werden. 1 µl Probe wurde mit 1 µl Probenpuffer, bestehend aus 50% Glycerin und 0,04% Orange G, versetzt und in die Geltasche pipettiert. Orange G ist ein sehr viel kleineres Molekül als Bromphenolblau und läuft dementsprechend sehr viel schneller durch das Gel, ungefähr in der gleichen Höhe wie ungebundene Nukleotide. Das Mikrogel wurde im Dunkeln bei den gleichen Konditionen wie eine normale Gelelektrophorese (10 V pro cm Gellänge) einer Spannung unterzogen. Wenn die Orange G Molekülfront gerade aus dem Gel gelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet, das Gel auf dem Objektträger mit Präzisionswischtüchern abgetrocknet und in einem Trockenschrank mit Umluft bei 65°C getrocknet. Anschließend wurde die Größenverteilung der markierten cDNA im Scanner analysiert.
Als Größenstandard wurden markierte PCR-Fragmente hergestellt. Hierfür wurden zwei beliebige Primer, mit denen sich ein PCR-Produkt von ungefähr 500 bzw. 1000 bp Länge amplifizieren ließ, in einer PCR-Reaktion eingesetzt (siehe 2.8). Als Nukleotid-Mix wurde eine Mischung aus Einzel-Nukleotiden benutzt (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 5 mM dCTP) und zusätzlich in die PCR-Reaktion 1 µl Cy3 oder Cy5 (je 1 mM) gegeben. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit der Ethanol-Präzipitation (siehe 2.7.2) aufgereinigt, in 20 µl 1 x TE-Puffer gelöst und je 1 µl für ein Mikrogel eingesetzt. Hierbei können zwei unterschiedlich markierte PCR-Fragmente in dieselbe Geltasche pipettiert werden.
Als Ergebnis einer Markierungsreaktion mit Cy3 oder Cy5 wird ein Gemisch an cDNA-Produkten erwartet, die sich um die Größe von 600 Basenpaaren verteilen (Bowtell und Sambrook, 2003).

**Lösungen und Reagenzien für die Elektrophorese**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| TEE-Puffer | 40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA (aus 50 x TEE) |
| Probenpuffer | 0,04% Bromphenolblau oder Orange G, 50% Glycerin |
| Größenstandard | GeneRuler™ 1-kb-ladder |
| 1% Agarose | 1 g SeaKem LE Agarose in 100 ml TEE-Puffer aufkochen |

## 2.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), die auch als „Enzymatische DNA-Sequenzierung“, „Didesoxy-Sequenzierung“ oder „Kettenabbruch-Verfahren“ bezeichnet wird, stellt die Grundlage der in dieser Arbeit eingesetzten Sequenziermethode dar. Hierbei werden durch eine Taq-Polymerase ddNTPs in die neusynthetisierte DNA eingebaut und führen zum Kettenabbruch. Die vier ddNTPs sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die während der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in der Kapillare durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch die Ansammlung unterschiedlich langer DNA-Fragmente ergibt sich die Sequenz des DNA-Abschnitts.
Es wurde der Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet.
Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte mit dem Jet Quick Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierbei wurden die Fragmente in $H_2O$ eluiert, da das EDTA des TE-Puffers die Sequenzreaktion stören kann. Die eingesetzte DNA-Menge für die Sequenzreaktion ist abhängig von der Größe des PCR-Produktes. Angaben hierzu finden sich im Protokoll des Herstellers.

**Zusammensetzung einer Sequenzreaktion**

| Komponente | Menge [in µl] |
|---|---|
| Big Dye Sequencing Puffer | 3,5 |
| Big Dye Terminator Mix 3.1 | 1 |
| Template | X |
| Primer [10 µM] | 1 |
| $H_2O$ | *ad* 10 |

Eine Sequenzreaktion verläuft analog zu einer PCR-Reaktion. Ein entsprechendes Programm ist in nachstehender Tabelle angegeben. Im Unterschied zu einer PCR-Reaktion wird bei der Sequenzreaktion nur ein Primer eingesetzt, wodurch es nicht zu einer exponentiellen, sondern nur zu einer linearen Zunahme der neusynthetisierten Stränge kommt. Als Thermocycler wurde der UNO 40 Thermoblock mit beheizbarem Deckel benutzt.

**Zeit- und Temperatur-abhängige Schritte einer Sequenzierreaktion**

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [s] |
|---|---|---|
| Denaturierung | 96 | 60 |
| Denaturierung | 96 | 10 |
| Anlagerung | X[1] | 5 |
| Verlängerung | 60 | 240 |
| Kühlung | 4 | ∞ |

[1]Die Anlagerungs-Temperatur der Primer ist Sequenz- und Konzentrationsabhängig und wurde nach der Formel in Kapitel 2.8 berechnet.

## 2.11 Auftrennung und Markierung von Penicillin-Bindeproteinen

Zur Überprüfung der β-Laktam-Bindefähigkeit der PBPs von PBP-Mutanten und des Referenzstammes R6 wurden die PBPs mit Bocillin markiert und anschließend durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.
2 ml-Aliquots von *S. pneumoniae*-Kulturen, die bis ca. N 80 gewachsen waren, wurden bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80°C eingefroren. Für Bindungsstudien wurden die Pellets in so viel 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 resuspendiert, dass 5 µl Suspension 1 ml Kultur bei N 20 entsprach.
Die anschließende SDS-PAGE erfolgte nach den Prinzipien des von Laemmli (Laemmli, 1970) verwendeten Protokolls. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das alle hydrophoben Gruppen innerhalb eines Proteins über seine lipophile Kohlenwasserstoff-Kette bindet und so seine große negative Ladung auf die Proteine überträgt. Dadurch wird die eigentliche Ladung des Proteins maskiert und die SDS-beladenen Proteine haben ein nahezu identisches Ladungs-Masse-Verhältnis. Deshalb werden diese Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel fast ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht getrennt.
Als Längenstandard für SDS-Gele diente der „Dalton Mark VII-L for SDS Gel Electrophoresis“. Die Auftragsmenge betrug standardmäßig 10 µl aufgekochte Lösung. Die Proteingrößen betrugen 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14,2 kDa.
Für die Polyacrylamidgele wurden 1,1 mm dicke Spacer und Kämme mit 25 Taschen (2,5 mm Breite) verwendet. Die Untergele (Trenngele) wurden luftblasenfrei bis ca. 1,5 cm unterhalb des Kammendes gegossen, dünn mit wassergesättigtem Buthanol überschichtet und 1 h bei RT zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Buthanol mit Wasser abgespült und das Obergel (Sammelgel) über das Untergel gegossen.
Das Glasplattensandwich wurde bis zum Ende der Ohrenplatte mit der Lösung für die Obergele gefüllt. Nun wurde der Kamm schräg (zur Vermeidung von Luftblasen) eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 1 h) konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut werden, die anschließend mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Verbliebene Luftblasen wurden mit einer Spritze ausgetrieben und der Kamm wurde vorsichtig gezogen.
Die markierten Proben wurden mit 20 µl blauem Probenpuffer (+ β-Mercaptoethanol, 5:2) gemischt, 2 min aufgekocht und 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Proteinproben werden auf das niederprozentige Sammelgel aufgetragen und konzentrierten sich nach Anlegen einer elektrischen Spannung am Übergang von Sammelgel zu Trenngel zu einer scharfen Bande. Im Trenngel wurden die Proteine dann nach der von ihrem Molekulargewicht abhängigen elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt. Der Lauf erfolgte bei 80V im Obergel und 200V im Untergel.
Für die Bocillin-Markierung wurde eine Standardprobe mit 5 µl Natriumphosphatpuffer + 0,2% Triton-X-100 und 4 µl Bocillin-Lösung (0,01 mM) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert.
Das Gel wurde nach dem Lauf aus dem Glasplatten-Sandwich gelöst und vorsichtig auf die angefeuchtete Glasplatte des Fluorimager 595 gelegt und ausgewertet. Anschließend wurde zur Kontrolle des Laufverhaltens der SDS-PAGE eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Das Gel wurde in einer Wanne mit Färbepuffer überschichtet. Beides wurde kurz in der Mikrowelle aufgekocht und danach 10 min auf einem 3D-Schwenker geschwenkt. Der Färbepuffer wurde dann gegen Entfärber ausgetauscht, in welchem das Gel über Nacht schwenkte.

**Lösungen und Reagenzien für die Proteinmarkierung und -auftrennung**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 20 mM Natriumphosphatpuffer | 1:50 aus 1 M Stocklösung |
| SDS-Laufpuffer (5x) | 30 g Tris, 144g Glycin, 10 g SDS, auf 2 Liter $H_2O$ auffüllen |
| Probenpuffer | 10 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 7,5 ml 10% SDS, 7,5 ml 98% Glycerin, 1,5 mg Bromphenolblau |
| Färbepuffer | 2,5 g Coomassie brilliant blue G-250, 500 ml Methanol, 90 ml Essigsäure, auf 1 Liter $H_2O$ auffüllen |
| Entfärber | 200 ml Methanol, 70 ml Essigsäure, auf 1 Liter $H_2O$ auffüllen |
| Untergel (20 ml) | 5 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30:0,8), 5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 9,7 ml $H_2O$, 0,2 ml 10% SDS, 5 µl TEMED, 50 µl Ammonium-Persulfat (10%) |
| Obergel (5 ml) | 0,85 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30:0,8), 1,25 ml Tris/HCl pH 8,8, 2,85 ml $H_2O$, 50 µl 10% SDS, 5 µl TEMED, 50 µl Ammonium-Persulfat (10%) |
| 0,2% Triton-X-100 | 1:50 aus 10%-Stocklösung in $H_2O$ verdünnen |
| Bocillin-Lösung | 1 mM-Lösung mit $H_2O$ hergestellt |

## 2.12 Inaktivierung von Genen durch Integration einer Resistenzkassette

Die von Dorothea Zähner erstellten Integrationen in den *ciaR*- und den *ciaH*-Genen (Zähner, 2001) wurden aus den entprechenden Stämmen KP1 (*ciaR*) und KP2 (*ciaH*) mit den Primern aus Tab. 2.6 amplifiziert und als PCR-Produkt in andere Stämme transferiert.
Um die Beteiligung eines bestimmten Genproduktes an einem Phänotyp zu klären, wurden Integrationsmutanten hergestellt, die ein Genprodukt nicht mehr funktionstüchtig herstellen konnten. Die Konstruktionsmethode beruht auf der überlappenden PCR (Link *et al.*, 1997; Chalker *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005). Diese ist im Gegensatz zur konventionellen Klonierung mit einem Vektor sehr viel schneller durchführbar. Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Anfälligkeit gegenüber Mutationen, die in der PCR entstehen können.
Bei der überlappenden PCR wurden in Einzelreaktionen drei PCR-Fragmente hergestellt (siehe Abb. 2.1). Diese wurden aufgereinigt, um die Primer zu entfernen. Für diese einzelnen PCR-Fragmente wurden die Primer so ausgewählt, dass das 3'-Ende des upstream flankierenden Fragmentes mit dem 5'-Ende des *ermAM*-Fragmentes und das 3'-Ende des *ermAM*-Fragmentes mit dem 5'-Ende des downstream flankierenden Fragmentes komplementär ist. So kann in einer überlappenden PCR-Reaktion, die alle drei Fragmente aber keine Primer enthält, ein einziges DNA-Fragment hergestellt werden. Dieses kann durch Zugabe der Endprimer (also vorwärts-Primer von Fragment 1 und rückwärts-Primer von Fragment 3) amplifiziert werden. Als überlappende Sequenz zwischen den Fragmenten wurde eine synthetische Sequenz von 20 (L1) und 21 (L2) Basen ausgewählt (siehe Abb.2.1).
Als Resistenzmarker wurde die *ermAM*-Kassette aus den Stämmen benutzt, welche von Throup *et al.* (2000) hergestellt wurden. Diese Resistenzkassette ist 920 bp lang und besitzt einen konstitutiven Promotor, aber kein Terminationssignal (Martin *et al.*, 1987; Lunsford und London, 1996).
Welche Oligonukleotide für welche Konstruktion benutzt wurden, geht aus den Namen der Oligonukleotide hervor (Tabellen 2.7 und 2.8). Die Primer ermAM_Link1 und ermAM_Link2 wurden nur für die Inaktivierung von *spr0931* benutzt. In Abb. 2.1 ist die Methode schematisch aufgezeichnet.
Oft konnte in dem letzten amplifizierenden Schritt kein eindeutiges Produkt generiert werden, so dass eine Größenauftrennung über ein Agarosegel mit anschließendem Ausschneiden der entsprechenden DNA notwendig war. Das so erzielte PCR-Produkt wurde in die Bakterien transferiert.

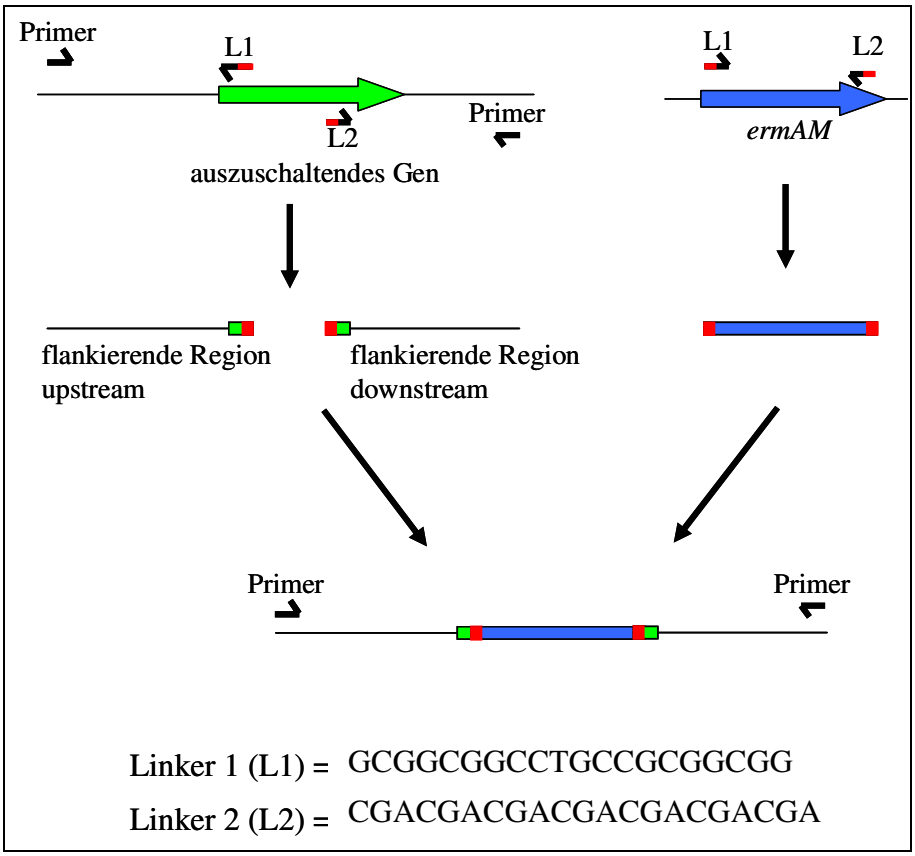



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Konstruktion von Deletionsmutanten**

Grün: das Gen, welches ausgeschaltet werden soll. Blau: Erythromycinresistenzkassette *ermAM*. Rot: Linkersequenzen. Die flankierenden Bereiche zu dem Gen wurden amplifiziert, wobei die in dem Gen liegenden Primer eine Linkersequenz hatten. In einer überlappenden PCR-Reaktion konnten die drei Fragmente in ein Produkt überführt werden.

## 2.13 Globale Transkriptionsanalysen mit der Mikroarray-Technik

Der Mikroarrayprozess als solcher besteht aus fünf Arbeitsschritten: der Herstellung des Biochips, der Herstellung der markierten Probe, der Hybridisierung, der Datenaquisition und der Datenanalyse. Eventuell stellt die Herstellung der Features einen weiteren Schritt dar. In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erworbenes Oligo-Set verwendet. Jeder Schritt alleine ist wichtig für den gesamten Prozess, da Fehler in den einzelnen Schritten das Gesamtergebnis negativ beeinflussen können. Die einzelnen Schritte sind nachfolgend näher beschrieben.

## 2.14 Das *Streptococcus pneumoniae* R6 Oligo-Set

Als Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Experimente diente das *Streptococcus pneumoniae R6* Oligos-Set von MWG Biotech AG. Dieses beinhaltete 2018 genspezifische sowie 3 Arabidopsis-spezifische 50mer-Oligos. Es waren keine Oligos für intergenische Regionen vorhanden. Das *S. pneumoniae* Genom enthält 2046 Gene. Somit waren für 28 Gene keine Oligos aufgrund von Sequenzähnlichkeiten vorhanden. Die 3 Arabidopsis-spezifischen Oligos fungierten als Negativkontrollen und waren je 10 x zufällig in den Mikrotiterplatten (und damit auf dem Chip) verteilt. Die verwendeten Oligos besaßen an ihrem 5'-Ende einen Amino-C6-Linker, der als reaktive Gruppe auf Aldehyd- oder Epoxy-Slides fungierte. In einer wässrigen Umgebung wurden dadurch kovalente Iminbindungen (Schiff'sche Basen) gebildet.
Die Oligos wurden in 28 µl 3 x SSC + 1,5 M Betain gelöst. Die Endkonzentration der Oligos betrug 50 µM und entsprach den optimalen Bedingungen für die verwendeten Epoxy-Slides. Weiterhin waren die Oligos auf sechs Mikrotiterplatten verteilt, von denen die Mikrotiterplatte Nummer sechs zu zwei Drittel nur mit Puffer gefüllt war. Die Reihenfolge der Mikrotiterplatten im Spottingprozess war 1, 2, 3, 6, 4, 5, damit nicht die Puffer-Spots am Ende eines jeden Subarrays waren. Die Mikrotiterplatten wurden bei -20°C, mit einer Adhäsionsfolie abgedeckt, gelagert.

## 2.15 Herstellung der Biochips

Das Biochipformat ist geeignet für eine automatisierte Herstellung. Drei Herstellungsverfahren sind gleichwertig zur Biochipfabrikation verbreitet: die Photolithographie, das Ink-Jet-Verfahren (z.B. die Piezo-Technik) und das Kontakt-Verfahren. Jedes Verfahren hat spezifische Vor- und Nachteile. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren ist das Kontakt-Verfahren, welches auf direktem Oberflächenkontakt beruht. Ein Printkopf, welcher Mikrospotting-Pins (SMP3) enthält, ermöglicht den Transfer von Lösungen von einer Mikrotiterplatte auf Glassslides. Ein XYZ-Bewegungskontrollsystem garantiert eine exakte Herstellung eines Oligonukleotid-, eines cDNA- oder eines Biomolekül-Mikroarrays.
Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Biochips wurde der SpotArray$^{TM}$24 Microarray Spotting System von PerkinElmer mit 32 SMP3-Pins von Telechem benutzt. Es wurde die dazugehörige Software SpotArray$^{TM}$ verwendet. In dieser Software wurden zunächst die von MWG Biotech AG gekauften, mit Oligos bestückten Mikrotiterplatten definiert. Dazu wurde der zu den Mikrotiterplatten mitgelieferte Excel-File so umgeschrieben, dass nur Informationen für je eine Platte enthalten waren. Diese wurden um die entsprechenden Kopfzeilen, die im SpotArray$^{TM}$-Handbuch beschrieben sind, erweitert, als *.txt-File abgespeichert und in die SpotArray-Software als „Plate" eingeladen. Schließlich wurden die Mikrotiterplatten, deren Oligos zusammen auf einen Slide gespottet werden

sollten, in einem „Plate set“ zusammengefasst. Das Print-Protokoll wurde wie in folgender Tabelle programmiert.

**Einstellungen in dem verwendeten Spotting-Protokoll**

| Auswahlposition | Einstellung |
|---|---|
| Number of plates per plate change | 2 |
| Read barcodes on plates | No |
| Read barcodes on substrates | No |
| Number of pre-prints after each sample load | 10 |
| Pre-print spot spacing, center to center [µm] | 500 |
| Number of times to print each spot within array | 2 |
| Nominal spot diameter [µm] | 150 |
| Spot spacing, center to center [µm] | 345 |
| Location on array on substrate | Center |
| Leave space for a barcode/label at bottom | Yes |
| Printing approach velocity [mm/s] | 10 |
| Printing departure velocity [mm/s] | 10 |
| Printing overtravel [µm] | 0 |
| Printing dwell time [ms] | 400 |
| Sample load overtravel [µm] | 100 |
| Sample load dwell time [ms] | 2500 |
| Substrate thickness [mm] | 1.1 |
| Maximum number of spots per sample load | 120 |
| Speed of printhead X-Y motion | Fast |
| Length of wash procedure [s] | 6 |
| Number of times to wash | 4 |
| Length of dry procedure after washing [s] | 3 |
| Do not print when humidity is outside of acceptable range | Yes |
| Minimum acceptable humidity [%RH] | 50 |
| Maximum acceptable humidity [%RH] | 70 |
| Control humidity level during printing procedure | Yes |
| Target humidity level [%RH] | 65 |
| Do not print when temperature is outside of acceptable range | No |

RH = Relative Humidity

Die Slides wurden, bevor sie in den Spotter gelegt wurden, mit einem Diamantschreiber beschriftet und mit einer Druckluftvorrichtung, die in einer mit Glaswolle gefüllten Spitze endete, gesäubert. Als Blockingslides fungierten normale Objektträger, die vor der Verwendung in einem Bunsenbrenner von Fettresten befreit, ca. 10 Minuten an der Raumluft gekühlt und durch Druckluft von Staubpartikeln gesäubert wurden. Die Mikrotiterplatten wurden vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut, bei 800 x g zwei Minuten abzentrifugiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Spotter wurde immer nur mit zwei Mikrotiterplatten gleichzeitig beladen, um der Verdunstung aus den Mikrotiterplatten entgegenzuwirken. Vor jedem Spotting-Prozess wurden die Pins gesondert in der Waschstation des Spotters gewaschen (Einstellungen: neun Sekunden Waschvorgang, fünf Wiederholungen des Waschvorgangs und vier Sekunden Trocknungszeit). Das Frischwasserreservoir des Spotters wurde mit Reinstwasser aus einer GenPure-Wasseraufbereitungs-Anlage befüllt.

Nach dem Starten des Spottingvorgangs wurden die vertikalen Pinbewegungen im Printkopf während des Spottens mit einer Taschenlampe überprüft. Zusätzlich wurde der Spottingvorgang nach ca. 12 Zyklen (insgesamt 24 Spots je Subarray) unterbrochen und das Vorhandensein der Spots auf den unfertigen Biochips kontrolliert. Sollten die Pins keine ausreichende Bewegung im Printkopf zeigen, z.B. indem sie an der höchst möglichen Bewegungsposition stecken bleiben oder sollten zu viele Spots auf den unfertigen Slides

fehlen (zuviel wurde als ganze Subarrays oder mehr als 2 Spots je Subarray definiert), wurde der Spotvorgang abgebrochen und die Pins einer externen Reinigung im Ultraschallbad unterzogen. Dazu wurden die Pins vorsichtig aus dem Printkopf mit einer Pinzette genommen und in ein „Floatable Cleaning Rack“ gesetzt. Die Position der Pins im Printkopf wurde im Cleaning Rack beibehalten, um eine Zuordnung der Fehler-verursachenden Pins auch nach der Reinigung zu ermöglichen. Das Cleaning Rack wurde mit den Pins für 10 Minuten im Ultraschallbad, welches mit einer 1%igen Lösung an „Micro Cleaning Solution“ gefüllt war, bei 35 kHz und RT gereinigt. Anschließend wurden die Pins für 10 Minuten in destilliertem Wasser im Ultraschallbad gesäubert. Hiernach wurde das Rack vorsichtig auf Präzisionswischtüchern abgetupft und die Pins mit einem Haushaltsfön getrocknet. Anschließend wurde die Spitze der Fehler-verursachenden Pins unter dem Mikroskop (10 x Vergrößerung auf einem Objektträger) auf Verunreinigungen und Beschädigungen untersucht. Nach der Reinigung der Pins wurde ein neuer Spottingvorgang gestartet. Wenn nach der Reinigung der Pins immer noch fehlende Spots beobachtet wurden, wurde zusätzlich zu einer erneuten Reinigung der Pins der Printkopf aus dem Spotter entfernt und gesäubert. Hierzu wurde der Printkopf mit 100% Ethanol ausreichend gewaschen, gegebenenfalls mit einer Spezialzahnbürste die Pin-Führungs-Löcher gesäubert, und anschließend mit einem Haushaltsfön getrocknet. Zur Sicherheit wurde der Printkopf, eingehüllt in Präzisionswischtüchern, zwei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Pins wurden nur für Reinigungszwecke aus dem Printkopf entfernt und blieben ansonsten in dem Printkopf im Spotter, um diese nicht unnötig zu verunreinigen und sie keiner Beschädigungsgefahr auszusetzen.
Nach dem Ende des Spottingvorgangs wurden die bespotteten Slides nach Herstellerangaben für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 85°C gebacken. Die für ca. 1 Jahr lagerfähigen Biochips wurden dunkel und trocken bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zusätzlich wurde ein *.gal-File, der die Information der Position der Oligos auf dem Biochip beinhaltete, je nach Print-Protokoll erstellt. Zur Überprüfung des Spotting-Prozesses wurde jeweils der letzte der 20 hergestellten Biochips einer Qualitätskontrolle unterzogen. Hierzu wurde der Biochip mit random Cy3-Nonameren oder mit markierter genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae R6* hybridisiert (siehe 2.17).

**Lösungen und Reagenzien für die Herstellung von Biochips**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 3 x SSC 1,5 M Betain | 0,45 M NaCl, 45 mM Na-Citrat, pH 7 + 1,5 M Betain |
| 1% Micro Cleaning Solution | 5 ml Stocklösung (100%) in 500 ml Reinstwasser |

## 2.16 Markierung der Hybridisierungsprobe

### 2.16.1 Markierung von RNA

Von der isolierten und quantifizierten RNA (siehe 2.7.7) wurden 50 µg in ein ERG überführt. Wenn die Konzentration der RNA-Lösung weniger als 2,77 µg/µl betrug, wurden die Proben in einer SpeedVac eingetrocknet. Hierzu wurde vorsichtshalber die SpeedVac mit RNaseZap gereinigt, um RNase-Kontaminationen zu minimieren. Die RNA wurde in 18 µl RNase-freiem $H_2O$ aufgenommen. Anschließend wurden 2 µl Denaturation Solution und 5 µl 10 µM random Oktamer-Primer zugegeben. Diese Mischung wurde für fünf Minuten bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix je nach Probenanzahl entweder separat für Cy3- und Cy5-Markierung oder nur ein Mastermix ohne Cy3 und Cy5 hergestellt. Für jede Markierungsreaktion enthielt der Mastermix die in der Tabelle aufgelisteten Komponenten.

**Markierung von RNA durch Umschreiben in cDNA und den Einbau von Cy-Nukleotiden (Cy3, Cy5)**

| Komponente | Menge [µl] | Endkonzentration |
|---|---|---|
| RNA-Lösung (inklusive Denaturation Solution und Oligonukleotide) | 25 | 2 µg/µl RNA<br>2 µM random Oktamere |
| $H_2O$ | 11 | |
| 10 x RT buffer | 5 | 1 x |
| dNTPs-Mix | 5 | 0,5 mM für dATP, dGTP, dTTP, 0,08 mM für dCTP |
| Cy3 oder Cy5 (1 mM) | 1 | 20 µM |
| RNase-Inhibitor (40 Units/µl) | 0,5 | 20 Units |
| Labelstar-Reverse Transkriptase | 2,5 | |

Nach kurzem Mischen und Anzentrifugieren wurde der Ansatz aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Cy-Nukleotide in Alufolie eingepackt und anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
Am nächsten Morgen wurde die markierte cDNA über Aufreinigungssäulen (in dem Labelstar™-Kit enthalten) aufgereinigt. Hierzu wurde der Markierungsansatz mit 260 µl PB-Puffer versetzt und fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Beladen der Säule und Zentrifugation (10000 x g, 1 Minute, RT) wurde die Säule mit 750 µl LS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 11000 x g und 2 Minuten unterzogen, um die Säule vollständig zu trocknen. Die cDNA wurde mit 2 x 12,5 µl 65°C warmem Elutionspuffer eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C dunkel gelagert. Kurz vor der Hybridisierung wurden die unterschiedlich markierten Proben, die miteinander verglichen werden sollten, gemischt, in einer SpeedVac im Dunkeln eingeengt und in einem entsprechenden Volumen $H_2O$ aufgenommen (30 µl für die manuelle und 10 µl für die maschinelle Hybridisierung).

### 2.16.2 Markierung von genomischer DNA

Diese Methode beruht – ebenso wie das Markierungsverfahren von RNA – auf dem „Random Priming“. Hierbei wird Doppelstrang-DNA in Anwesenheit von random Hexameren denaturiert und die Rehybridisierung beider Targetstränge durch Abschrecken auf niedrige Temperaturen und durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen von Primern verhindert. Die Primer sind ein Gemisch aus verschiedenen Hexanukleotide unterschiedlicher Basenfolge (random primer), so dass statistisch gesehen jede Targetsequenz abgedeckt sein sollte. Bei der Elongationsreaktion durch das Klenow-Enzym, dem großen Subtilisin-Fragment des *E. coli*-DNA-Polymerase-Holoenzyms, werden unmarkierte dNTPs und Cy3- bzw. Cy5-modifizierte dCTPs eingebaut. Bei dieser Methode werden durch Strangverdrängung hohe Sondenausbeuten mit über 100% der eingesetzten Template-DNA erreicht. Das verwendete Protokoll wurde nach Pollack *et al.* (1999) modifiziert.
Die Zusammensetzung eines Markierungsansatzes ist in unten stehender Tabelle dargestellt. Die eingesetzte DNA wurde in einer SpeedVac eingeengt, so dass 4 µg DNA in 12 µl 1 x TE oder $H_2O$ gelöst waren. Diese wurden für 10 Minuten bei 96°C denaturiert, mit den in der Tabelle genannten Lösungen vermischt und über Nacht bei 37°C in einer Alufolie verpackt inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 0,1 M EDTA gestoppt und mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.7.2). Das getrocknete Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

**Zusammensetzung eines Markierungsansatzes von genomischer DNA**

| Komponente | Menge [µl] | Endkonzentration |
|---|---|---|
| genomische DNA | 12 | 0,2 µg / µl |
| 10 x dNTP-Mix [1 bzw. 0,5 mM] | 2 | dATP, dGTP, dTTP = 100 µM, dCTP = 50 µM |
| random Hexamere (4 µg/µl) | 2 | 0,4 µg / µl |
| 10 x Reaktionspuffer | 2 | 1 x |
| Cy3- oder Cy5-dCTP [1 mM] | 1 | 50 µM |
| Klenow-Enzym (10 Units/µl) | 1 | 0,5 U / µl |
| Gesamtvolumen | 20 | |

**Lösungen und Reagenzien für die Markierung von RNA und genomischer DNA**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| Cy-Nukleotide | 1 mM Cy-dCTP |
| RNase Inhibitor | 40 Units/µl RNasin |
| random Oktamere | 100 µM |
| random Hexamere | 4 µg/µl |
| 10 x dNTP-Mix | dATP, dGTP, dTTP je 1 mM, dCTP 0,5 mM |
| 10 x Reaktionspuffer | 5 M Tris-HCl, 1 M $MgCl_2$, 10 mM DTE, 20 mg/ml BSA |
| Klenow-Enzym | 10 Units/µl |
| 0,1 M EDTA pH8 | |

### 2.16.3 Qualitätskontrolle der Markierungsreaktion

Um die Effizienz der Markierungsreaktion zu messen wurden die Konzentration und die Markierungseffizienz der cDNA mit dem NanoDrop quantifiziert. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die DNA bei 260 nm, wohingegen die Fluorophore Cy3 und Cy5 bei 550 nm bzw. 633 nm absorbieren. Durch Einbeziehung des Absorptionskoeffizienten und eines Korrekturfaktors lässt sich ein Verhältnis von Fluorophor zu Base angeben. Hierfür wurde zuerst die Extinktion bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen. Anschließend wurde der Fluorophoreffekt zur Extinktion bei 260 nm abgezogen:

$$E_{base} = E_{260} - (E_{dye} * CF_{260})$$

Hierbei ist $E_{base}$ die Extinktion der Basen bei 260 nm, $E_{dye}$ die Extinktion des Fluorophors bei der entsprechende Wellenlänge und $CF_{260}$ der Korrekturfaktor für das entsprechende Fluorophor bei 260 nm. Dieser ist für Cy3 = 0,08 und Cy5 = 0,05. Schließlich kann das Verhältnis von Fluorophor zu Base berechnet werden:

$$\frac{Base}{Fluorophor} = \frac{(E_{base} * \varepsilon_{dye})}{(E_{dye} * \varepsilon_{base})}$$

$\varepsilon_{dye}$ ist der Absorptionskoeffizient für das Fluorophor. Er beträgt 150000 $cm^{-1}M^{-1}$ für Cy3 und 250000 $cm^{-1}M^{-1}$ für Cy5. $\varepsilon_{base}$ ist der Absorptionskoeffizient für doppelsträngige DNA und beträgt 6600 $cm^{-1}M^{-1}$. Das Verhältnis liegt für Cy3 und Cy5 in der Regel zwischen 8 und 65 und ist abhängig von der Ausgangs-RNA (z.B. GC-Gehalt) und den Eigenschaften der Reversen Transkriptase. Der Farbstoff Cy3 wird aufgrund seiner sterischen Gegebenheiten in der Regel besser eingebaut als Cy5, weshalb das Basen / Fluorophor-Verhältnis für Cy3 immer ungefähr 1,34 x größer ist als das Verhältnis für Cy5.
Eine weitere Qualitätskontrolle stellt die Größenauftrennung mit der Mikrogel-Technik dar (siehe 2.9).

## 2.17 Hybridisierung

### 2.17.1 Manuelle Hybridisierung

Um die Biochips für die Hybridisierung vorzubereiten, wurden die Biochips in Küvetten in einer Objektträgerhalterung mit den entsprechenden Lösungen auf einem 3D-Schüttler behandelt. Das Protokoll, welches für die Schott Nexterion® Slide E angewandt wurde, ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

**Prozessierung der bespotteten Slides als Vorbereitung für die manuelle Hybridisierung**

| Lösung | Zeit [min] | Temperatur |
|---|---|---|
| 0,1 % Triton-X-100 | 1 x 5 | RT |
| 0,1 M HCl | 2 x 2 | RT |
| 100 mM KCl | 1 x 10 | RT |
| $H_2O$ | 1 x 1 | RT |
| Blocking-Lösung (50 mM Ethanolamin, 0,1 M Tris, 0,1 % SDS (immer frisch dazugeben), pH 9,0) | 1 x 10 (Schwenkwasserbad) 1 x 10 (auf Rocky 3D inkubieren) | 50°C |
| $H_2O$ | 1 x 1 | RT |

Anschließend wurden die Biochips in 50 ml Falcon-Tubes bei 500 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Die letzten Flüssigkeitstropfen wurden mit einer Druckluftvorrichtung, die in einer mit Glaswolle gefüllten Spitze endete, entfernt.
Die extra großen Kleberahmen wurden auf einen von Staub befreiten Biochip geklebt und fest angedrückt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass nicht die Fläche mit den Spots beklebt wurde. Für eine möglichst feste Adhäsion der Rahmen an die Biochips sollten diese eine Zeit lang (15 Minuten) ungestört binden können. In der Zwischenzeit wurde die in der SpeedVac eingeengte Hybridisierungsprobe in 30 µl $H_2O$ gelöst, mit 270 µl salzhaltigem Hybridisierungspuffer versetzt und für 10 Minuten bei 96°C im Heizblock unter einer Alufolie denaturiert. Anschließend wurde die Probe kurz abzentrifugiert, auf den Biochip innerhalb des Kleberahmens getropft und gleichmäßig verteilt. Die Hybridisierungsprobe wurde innerhalb des Kleberahmens durch einen Deckel eingeschlossen. Der so präparierte Biochip wurde in einer Hybridisierungskammer, deren Vertiefungen mit je 100 µl $H_2O$ ausgefüllt waren, über Nacht in einem Wasserbad auf einem 3D-Schüttler bei 42 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Biochip aus der Hybridisierungskammer entnommen, mit einem Skalpell der Kleberahmen entfernt und in Küvetten auf einem 3D-Schüttler, abgedeckt mit einer Alufolie, nach folgenden Angaben gewaschen.

**Waschschritte nach der manuellen Hybridisierung**

| Lösung | Zeit [min] | Temperatur |
|---|---|---|
| 0,1 % SDS, 2 x SSC | 10 | 30°C |
| 1 x SSC | 10 | 30°C |
| 0,1 x SSC | 10 | 30°C |
| 0,1 x SSC | 1 | RT |

Der hybridisierte Biochip wurde anschließend in einem 50 ml Falcon-Tube bei 500 x g und fünf Minuten abzentrifugiert und die restliche Flüssigkeit mit einer Druckluftvorrichtung entfernt. Um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern wurden diese mit einer DyeSaver-Lösung behandelt. Dazu wurde der Biochip ca. 10 Sekunden in die DyeSaver-Lösung getaucht und unter dem Abzug für fünf Minuten getrocknet. Die DyeSaver-Lösung wurde aus vier Flaschen mit je 28 ml Flüssigkeit in einer undurchsichtigen 100 ml Schottflasche hergestellt und ist für viele Biochips anwendbar.

### 2.17.2 Maschinelle Hybridisierung

Da die manuelle Hybridisierungstechnik sehr anfällig gegenüber mechanischen Fehlern ist, wurde im Verlauf dieser Arbeit eine Hybridisierungsmaschine (Tecan HS400) gekauft. Der Vorteil einer maschinellen Hybridisierung liegt in der größeren Reproduzierbarkeit und dem geringeren Arbeitsaufwand und den damit verbundenen geringeren Fehlerquellen. Außerdem wird auch ein geringeres Probenvolumen verwendet, wodurch eine höhere Probenkonzentration und eine höhere Signalstärke erzielt werden kann. Bei der maschinellen Hybridisierung kann auch das Vorbereiten der Biochips für die Hybridisierung in der Maschine bewerkstelligt werden. Ein großer Vorteil der maschinellen Hybridisierung ist die aktive Bewegung der Hybridisierungsprobe. Durch ein Pumpsystem wird die Probe während der Hybridisierung bewegt, so dass große Moleküle schneller zu ihrem Hybridisierungspartner gelangen können. Bei der manuellen Hybridisierung können sich Moleküle nur durch Diffusion bewegen. Die Diffusion ist ein passiver und damit langsamer Prozess. Das Protokoll für die maschinelle Hybridisierung wurde von der Firma Schott übernommen (siehe nachstehende Tabelle). Die Hybridisierungsprobe wurde in 10 µl Wasser gelöst und mit 90 µl Hybridisierungspuffer (1:1 Nexterion® Hyb und Formamid) versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 96°C denaturiert und in dem Probeninjektionsschritt auf die Biochips appliziert.

**Hybridisierungsprotokoll für die Nexterion® Slides E von Schott AG**

| Komponente | Wasch-Zeit [min] | Einwirk-Zeit [min] | Temperatur [°C] | Wiederholungen |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 % SDS | 0,5 | 0,5 | 25 | - |
| $H_2O$ | 0,5 | - | 25 | - |
| Prähybridisierungspuffer | 0,5 | 30 | 42 | - |
| Prähybridisierungspuffer | 0,5 | - | 40 | - |
| Probeninjektion | | | 40 | - |
| Hybridisierung; Temperatur: 40°C; Bewegungsfrequenz: mittel; Zeit: 16 Stunden | | | | |
| 2 x SSC, 0,1 % SDS | 1 | 0,5 | 30 | 1 |
| 1 x SSC | 1 | 0,5 | 30 | 1 |
| 0,1 x SSC | 1 | 0,5 | 30 | - |
| Slidetrocknung; Temperatur: 30°C; Zeit: 3 Minuten; | | | | |

Anschließend kann der Biochip aus der Maschine genommen und eingescannt werden. Eine weitere Behandlung mit dem DyeSaver muss unterbleiben, da sonst Verunreinigungen aus dem Randbereich des Slides, der außerhalb des O-Rings liegt und somit nicht prozessiert wurde, Verschmierungen innerhalb der gespotteten Fläche verursacht. Deshalb wurde auf rasches Einscannen der Slides nach der Hybridisierung geachtet.

**Lösungen und Reagenzien für die manuelle und maschinelle Hybridisierung**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 0,1 % Triton-X-100 | 1:100 in Wasser aus 10%iger Stammlösung |
| 0,1 M HCl | 9,86 ml von 37% HCl auf 1000 ml Wasser auffüllen |
| 100 mM KCl | 7,45 g KCl in 1000 ml Wasser |
| Blocking-Lösung | 50 mM Ethanolamin, 0,1 M Tris, 0,1 % SDS, SDS wurde aus 10%iger Lösung immer frisch dazugegeben |
| Hyb.-puffer (manuelle Hyb.) | Salzhaltiger Puffer von MWG Biotech AG |
| Hyb.-puffer (maschinelle Hyb.) | Nexterion® Hyb mit Formamid (1:1) |
| Prähybridisierungspuffer | 5 x SSC, 0,1 % SDS, 0,5 mg/ml BSA (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat, pH 7) |
| 0,1 % SDS | 1:100 in Wasser aus 10%iger Stammlösung |
| 20 x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7 |
| 0,1 % SDS, 2 x SSC | 10 ml 10%ige SDS-Lösung und 100 ml 20 x SSC-Lösung auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt |
| 1 x SSC | 50 ml 20 x SSC-Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt |

### 2.17.3 Hybridisierung mit random Cy3-Nonameren

Die random Cy3-Nonamere, ein Gemisch aus Nonameren mit statistisch jeder möglichen Basenabfolge, besitzen am 5'-Ende ein kovalent gebundenes Cy3-Molekül. Die Hybridisierungstemperatur dieses Gemisches variiert von 4 – 40°C und liegt durchschnittlich ungefähr bei der RT. Es wurden 3000 pmol Cy3-Nonamere in 100 µl Reinstwasser gelöst, so dass eine Endkonzentration von 30 µM hergestellt wurde. Der Hybridisierungsansatz enthielt die in der Tabelle aufgeführten Komponenten.

**Hybridisierungsansatz mit random Cy3-Nonameren**

| Komponente | Menge [µl] | Endkonzentration |
|---|---|---|
| 20 x SSC | 8 | 4 x |
| 5 mg/ml Hefe-tRNA | 4 | 0,5 mg/ml |
| 1 M HEPES, pH 7 | 2 | 50 mM |
| 1 % SDS | 8 | 0,2 % |
| 30 µM random Cy3-9mer | 10 | 7,5 µM |
| $H_2O$ | 8 | |

Dieser Hybridisierungsansatz wurde für 2 Minuten bei 96°C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Probe wurde auf die gespottete Fläche des Biochips pipettiert und mit einem Deckgläschen verteilt und abgedeckt. Die Hybridisierung fand in einer Hybridisierungskammer im Dunkeln bei RT für 10 Minuten statt. Schließlich wurde der Biochip in 2 x SSC, 0,2 % SDS für eine Minute gewaschen, bis das Deckgläschen abgefallen war. Der zweite Waschpuffer enthielt 0,2 x SSC, der dritte 0,05 x SSC, welche beide für fünf Minuten in einer Küvette bei RT appliziert wurden. Der Biochip wurde in einem 50 ml Falcon Tube bei 500 x g getrocknet und bei 550 nm eingescannt.

**Lösungen und Reagenzien für die Hybridisierung mit den Cy3-Nonameren**

| Komponente | Bestandteile, Menge/Konzentration |
|---|---|
| 20 x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7 |
| 1 M HEPES | 0,23 g in 1 ml Wasser |
| Hefe-tRNA | 5 mg/ml in $H_2O$ |
| 1 % SDS | 1 g SDS in 100 ml Wasser |
| Random Cy3-9mer | 3000 pmol in 100 µl Wasser |
| 2 x SSC 0,2 % SDS | 2 g SDS, 21,03 g NaCl, 8,82 g Na-Citrat in 1000 ml Wasser, pH 7 |
| 2 x SSC | 21,03 g NaCl, 8,82 g Na-Citrat in 1000 ml Wasser, pH 7 |

## 2.18 Einscannen und Erfassen der Bilddaten

Die Ergebnisse der Hybridisierung wurden als Bilddaten im ScanArray®4000 Microarray Analysis System erfasst. Hierzu wurde die EasyScan-Methode der ScanArray®Express Software, Version 2.1, ausgewählt und zuerst der ganze Biochip mit einer niedrigen Auslösung von 50 µm gescannt. Dabei wurde die Photomultiplier Tube (PMT)-Stärke so justiert, dass beide Fluoreszenz-Kanäle ungefähr gleiche Signalintensitäten lieferten. Anschließend wurde der Scanbereich auf die bespottete Fläche eingegrenzt und mit den ermittelten PMT-Einstellungen mit einer Auflösung von 5 bzw. 10 µm aufgenommen. Die Laserstärke wurde mit 75% konstant gehalten. Der Fokus der Laser wurde in regelmäßigen Abständen mit der ScanArray®Express Software nachjustiert.

## 2.19 Analyse der Bilddaten

Die Bilddaten wurden mit der EasyQuant-Methode der ScanArray®Express Software analysiert. Hierfür wurden die Bilddaten und der entsprechende *.gal-File geöffnet und durch die „Adjust Template and Register Images“-Auswahlmöglichkeit das Raster den aktuellen Spots auf dem Biochip angepasst. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mit den folgenden Einstellungen.

**Einstellungen zur Quantifizierung mit der ScanArray®Express -Software**

| Auswahlposition | Einstellung |
|---|---|
| Quantifizierungsmethode | « Adaptive circle » |
| « Adaptive circle »-Einstellungen | Durchmesser:<br>Minimaler Spotdurchnesser (% von nominal): 50<br>Maximaler Spotdurchmesser (% von nominal) 180 |
| Normalisierungsmethode | LOWESS |

Schließlich wurde das Rasteralignment manuell überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. Der so erhaltene *.csv-File wurde mit der Excel-Software weiterbearbeitet. Hier wurden die Kontrollen (Puffer-Spots und Arabidopsis-Kontrolloligos) überprüft und herausgefiltert sowie Spots, deren Intensität zu gering war. Der Schwellenwert für diese Intensität wurde durch den Mittelwert plus 2 Standardabweichungen der Arabidopsis-Kontrolloligos definiert. Die Standardabweichung wurde in Excel mit der STABW-Funktion berechnet.
Ein weiteres Auswahlkriterium für die Qualität der Spots war das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (S/H-Ratio). Alle Spots, deren S/H-Verhältnis < 3 betrug, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.
Der so modifizierte *.csv-File wurde in die ArrayInformatics Database Software (PerkinElmer) eingespeist. Die ArrayInformatics Database-Software diente als Datenbank, deren Daten nicht gelöscht werden und so auch nicht verloren gehen können. Zur weiteren Analyse der Daten wurden diese mit den Daten der anderen zu einem Experiment gehörenden Hybridisierungen in die ArrayInformatics Visualisation Tool-Software eingeladen und als Microarray Worksheets dargestellt. Hierbei wird eine gemeinsame, nicht redundante Genliste von allen in diese Datei eingeladenen Daten erstellt. Die nicht normalisierten Daten wurden mit der LOWESS-Funktion dieser Software normalisiert. LOWESS (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing) ist eine intensitätsabhängige Normalisierungsmethode, die gute Ergebnisse sowohl bei gleichmäßig verteilten, als auch bei nicht gleichmäßig verteilten Daten liefert (Yang *et al.*, 2001). Die normalisierten Daten wurden im Scatter-Plot überprüft und gegebenenfalls mit der LOWESS Subarray-Normalisierung verglichen. Die Subarray-Funktion erlaubt eine Normalisierung innerhalb eines Subarrays (Teilstück eines Arrays, der von einem Pin hergestellt wird) und kann bei Hintergrundschwankungen bzw. leichten

Schmieren über den Array vorteilhaft sein. Schließlich wurden die Intensitätswerte und die Ratios (Verhältnisse von Intensitätsdaten) der normalisierten Daten von allen zu diesem Experiment gehörenden Hybridisierungen in ein Excel-Tabellenblatt kopiert, so dass die entsprechenden Werte (Intensitäten oder Ratios) der unterschiedlichen Hybridisierungen nebeneinander angeordnet sind. Da jedes Oligo zweifach auf einem Slide vorhanden ist, müssen die Daten zu einem Oligo in einer Zeile zusammengefasst werden, um sie statistisch analysieren zu können.
Nach der LOWESS-Normalisierung wurden Filterkriterien, mit denen Daten von schlechter technischer Qualität aus einem Experiment entfernt wurden, angewandt: a) wenn zu wenig Datenpunkte pro Gen vorhanden waren, wurde das Gen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen und b) wenn der Pearson-Korrelationsfaktor auf verschiedenen Ebenen (siehe Abb. 3.28) zu gering war, wurden die entsprechenden Slides aus der Analyse entfernt.
Um aus diesen Daten (in Ratios) differentiell exprimierte Gene zu identifizieren wurde eine multiple Teststatistik angewandt. Diese basiert auf der Durchführung eines statistischen Tests auf Expressionsänderung für jedes Gen, welches als Ergebnis in einem P-Wert angegeben wird. Der P-Wert ist definiert als die kleinste Zahl α, für welche die Wahl von α als Testniveau dieses Gen gerade noch als differentiell exprimiert angeben würde. Bei der multiplen Teststatistik ist es wichtig, logarithmierte Daten zu nehmen, da sich Ratios nicht normal, sondern log-normal verteilen, wie in Abb. 2.2 gezeigt (Limpert *et al.*, 2001). Die Berechnungen gliedern sich in folgende Schritte:

1. Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ratios eines Gens
2. Logarithmierung der Einzeldaten
3. Berechnung des arithmetischen Mittels der logarithmierten Daten, der Anzahl der Werte und der Standardabweichung der logarithmierten Daten
4. Durchführung eines zwei-seitigen Tests, wobei α der P-Wert, pt die Verteilungsfunktion der t-Verteilung, die mit der Software R (www.r-project.org) berechnet wurde, $\bar{x}$ der Mittelwert, n die Anzahl der Werte und s die Standardabweichung darstellen:

$$p = 2\left[1 - pt(\pm(1-\bar{x})\frac{\sqrt{n}}{s})\right]$$

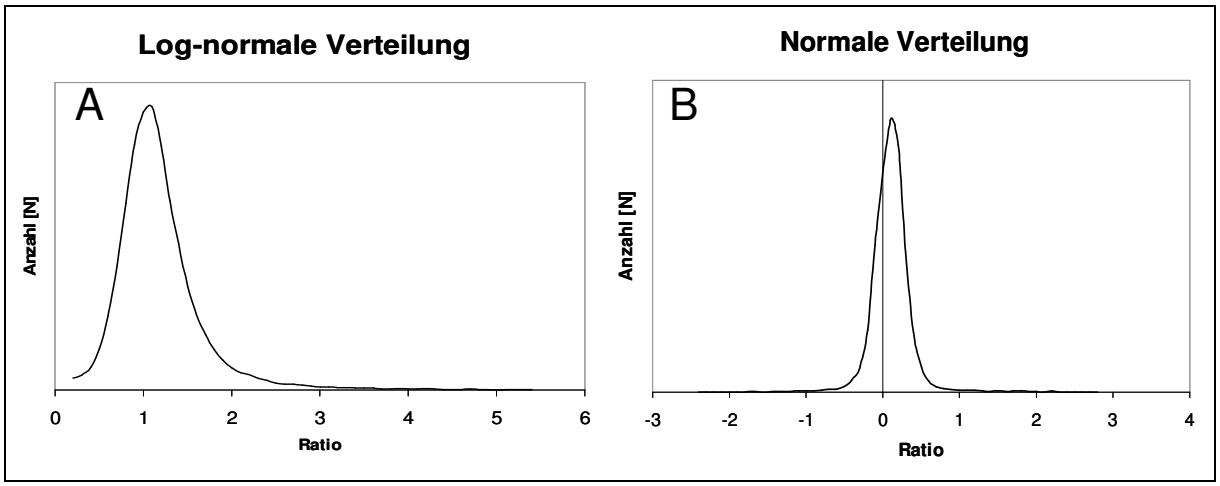



**Abb. 2.2: Verteilungsstatistik von nicht logarithmierten (A) und logarithmierten (B) Ratio-Daten**

Dargestellt sind Transkriptionsverhältnisse. Die Ordinate zeigt die Häufigkeit des Ratios, die Abszisse das Ratio. In A und B sind dieselben Daten aufgetragen. Die normal-verteilten Daten aus A wurden zur Basis von 10 logarithmiert und sind in B dargestellt.

In die Verteilungsfunktion pt gehen geschätzte Werte für den Erwartungswert der logarithmierten Ratios und die Standardabweichung ein. Die Berechnung für diese Schätzungen wurden aus Hübner (1996) entnommen. Für ein festgelegtes Signifikanzniveau von z.B. 5% ($\alpha = 0,05$) sind für 2000 Gene 100 signifikante Gene zu erwarten, die zufällig einen P-Wert < 5% haben, obwohl sie nicht signifikant sind. Aufgrund der hohen Anzahl an Genen auf einem Microarray ergibt sich eine hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnissen (Fehler 1. Art). Als Antwort hierauf wurden adjustierte P-Werte entwickelt, mit denen die family-wise error rate (FWER, Dudoit *et al.*, 2002) oder die false discovery rate (FDR, Benjamini and Hochberg, 1995) kontrolliert werden kann. Die FWER ist definiert als Wahrscheinlichkeit, dass eine ausgewählte Gengruppe mindestens ein falsch positives Ereignis enthält. Diese Strategie ist sehr konservativ und birgt die Gefahr, viele interessante Gene nicht zu identifizieren. Die FDR ist definiert als das Verhältnis aus falsch positiven zu allen ausgewählten Genen und kann minimiert werden, indem die Anzahl falsch positiver Ereignisse minimiert oder die Anzahl richtig positiver Ereignisse maximiert wird. Dieser Ansatz wurde entwickelt, da Mikroarray-Ergebnisse oft mit anderen Methoden überprüft werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Ansätze sind die Methoden nach Storey und Tibshirani (2001) bzw. Benjamini und Hochberg (1995). Das Verfahren nach Storey wurde mit der qvalue-Bibliothek (http://faculty.washington.edu/~jstorey/qvalue/) berechnet. Das Verfahren nach Benjamini und Hochberg wurde angewandt, um die FDR zu berechnen und die signifikanten Gene herauszufiltern. Als signifikant wurden Gene ausgewählt, die eine FDR < 1% aufwiesen. D.h. nach diesen Berechnungen sind < 1% der selektierten Gene falsch positive. Um auch die biologische Signifikanz der ermittelten Gene zu sichern, wurden nur Gene beachtet, deren Transkriptionsänderung > 2 oder < 0,5 betrug.

## 2.20 Computergestützte Datenverarbeitung und –analyse

Aufgrund der enormen Datenmenge an publizierten und in Datenbanken abgelegten Sequenzen wurden diese mit Hilfe von spezieller Software analysiert und abgefragt. Ebenso fallen bei der Mikroarray-Technik große Datenmengen an, für deren Analyse spezielle Software benötigt wurde. Es kamen die folgenden Programme zum Einsatz:

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) wurde benutzt, um homologe Sequenzen zu einer spezifischen Sequenz zu finden. Es wurde vom NanoBioCenter der Technischen Universität Kaiserslautern (NBC) zur Verfügung gestellt (http://nbc3.biologie.uni-kl.de/).
- Clone Manager Suite 7 und Enhance (Scientific und Educational Software) kann Restriktions- und Plasmidkarten erstellen. Diese Programme dienten auch der Translation von Nukleotidsequenzen.
- Artemis wurde benutzt, um die Lokalisation der Oligos des *S. pneumoniae* Oligo-Sets im R6-Genom darzustellen.
- ClustalX wurde verwendet, um spezifisch Sequenzen miteinander zu vergleichen. Diese wurden mit dem GeneDoc-Programm weiterbearbeitet.
- Programme des ExPaSy-Servers (Expert Protein Analysis System) des Swiss Institute of Bioinformatics wurden benutzt, um Proteinsekundär- und Tertiärstrukturen zu identifizieren. Insbesondere wurde mit dem TMHMM 2.0-Programm Transmembranhelices und mit dem SignalP 3.0-Programm Signalpeptide identifiziert.
- Der Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) wurde benutzt um Oligonukleotide auf Sekundärstrukturen und Selbstbindung zu untersuchen.
- In die Pathway Tools Omics Viewer-Software können Mikroarray-Ergebnisse metabolischen Funktionen zugeordnet werden.
- Für die Mikroarray-Datananalyse wurde die ScanArray®Express Software (Version 2.1) und die ArrayInformatics Database Software von PerkinElmer (Wellesley, USA) verwendet. Als statistische Analysesoftware diente die qvalue-Bibliothek (http://faculty.washington.edu/~jstorey/qvalue/) und die Software R (www.r-project.org). Das Expander-Programm wurde zur Identifizierung von Clustern benutzt (Shamir *et al.*, 2005).
- Microcal™ Origin™ Version 5.0 wurde zur graphischen Darstellung von Wachstumskurven benutzt.

Die Genomsequenz von *S. pneumoniae* wurde von THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH (TIGR) abgefragt und kann unter http://www.tigr.org/ eingesehen werden.

# 3. Ergebnisse

## A. Phänotypische Charakterisierungen des Cia-Systems

Das Cia-System wurde 1994 von Guenzi *et al.* zum ersten Mal beschrieben. Die Autoren berichten von einer T230P-Mutation in der Histidinkinase CiaH, welche in der C006-Familie von spontanresistenten Labormutanten in der dritten Selektionsstufe aufgetreten ist (siehe Abb. 1.2). Andere CiaH-Mutationen konnten in weiteren Mutantenfamilien gefunden werden. Dabei wurden Mutationen in der Sensor- (z.B. C305 N95D) und der Kinasedomäne (z.B. C306 T230P oder C102 Q236K) identifiziert. Zu allen Fällen konnte ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der genetischen Kompetenz und den CiaH-Mutationen festgestellt werden. Dabei wurden zwei Gruppen von Mutationen erkennbar: Die CiaH-Mutationen aus den Mutanten C401, C103, C104 und C305 führen nur in Kombination mit PBP2x-Mutationen zur Kompetenzdefizienz, die Mutationen aus C202 und C306 verursachen alleine diese Defizienz.

Bisher wurde hauptsächlich das $CiaH_{C306}$-Allel untersucht (Guenzi *et al.*, 1994; Zähner *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde zusätzlich das $CiaH_{C103}$-Allel analysiert, welches auch noch in einer unabhängigen Mutantenfamilie (C104) identifiziert werden konnte. Die $CiaH_{C103}$ A203T-Mutation trat in der ersten Selektionsstufe auf, gefolgt von zwei PBP2x-Mutationen in der zweiten und dritten Selektionsstufe.

Die Grundlage der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente sind Arbeiten von Mascher (2001), in denen zum ersten Mal die Notwendigkeit eines funktionellen Cia-Systems in einer bestimmten Mutantenfamilie aufgezeigt wurde.
Die Mutanten C103 – C303 sind geprägt durch einen schrittweisen Verlust in der Kompetenz, welche in der C303-Mutante zu einer kompletten Defizienz der Transformierbarkeit führt (Mascher *et al.*, 2006). Durch Inaktivierung des Cia-Systems in diesen drei Mutanten konnte die Notwendigkeit des Cia-Systems für die Vitalität der Zellen mit PBP2x-Mutationen nachgewiesen werden (Mascher, 2001). Die C303-Mutante ohne funktionelles Cia-System zeigte eine geringere Wachstumsrate, keine Stationärphase und sehr frühe Autolyse. Zugleich war die Lebensfähigkeit der C303-Zellen ohne Cia-System durch die erhöhte Lyse ca. 50-fach geringer (Mascher, 2001). Diese Beobachtung führte zu einem Experiment, in welchem die Fähigkeit zur Piperacillin-induzierten Lyse von Zellen mit unterschiedlichem Aktivierungszustand des Cia-Systems getestet wurde. In diesem konnte nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung des Cia-Systems durch die $CiaH_{C306}$ T230P-Mutation Lyse-protektive Eigenschaften hat. Die Deletion des Cia-Systems führt dagegen zu erhöhter Piperacillin-induzierter Lyse (Mascher *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen sollten durch die Anwendung von verschiedensten experimentellen Ansätzen erweitert werden. Dabei sollte auf den Einfluß von unterschiedlichen Bedingungen, die in die Zellwandsynthese eingreifen und das Wachtum von Cia-Mutanten beeinflussen, ausführlich eingegangen werden (siehe Kapitel 3.1).
In dieser Arbeit wurden zusätzlich Versuche mit verschiedenen Zellwandinhibitoren durchgeführt und die Rolle des Cia-Systems in Gegenwart von PBP-Mutationen beleuchtet. Letztendlich wurden auch Transkriptionsanalysen während der Behandlung von Zellwandinhibitoren analysiert (Kapitel 3.10). Diese Experimente zielten darauf ab, eine Vorstellung über den möglichen Aktivierungsprozess des Cia-Systems zu erhalten. Schließlich wurden die Transkriptionsmuster verschiedener spontanresistenter Labormutanten, die nach 5 Selektionsschritten erhalten wurden und Mutationen in mindestens 3 Genen enthielten, analysiert (Kapitel 3.8 und 3.9).

## 3.1 Das Cia-System schützt vor Zellwandstress

Ein erster Hinweis darauf, dass die Cia-vermittelte Resistenz nicht auf β-Laktam-Antibiotika beschränkt ist, wurde von Dorothea Zähner geliefert (D. Zähner, pers. Mitteilung). Sie untersuchte die Empfindlichkeit von Stämmen mit aktiviertem und deletiertem Cia-System bezüglich einiger weiterer Zellwandantibiotika, die einer ganz anderen Klasse angehörten als β-Laktam-Antibiotika, wie z.B. Vancomycin. Auch hier zeigte sich eine offensichtlich protektive Wirkung eines aktivierten Cia-Systems.
Aufbauend auf den Ergebnissen von Zähner und Mascher wurden in dieser Arbeit systematisch MHK- und Lyse-Messungen von verschiedensten Zellwandantibiotika und weiteren biologisch aktiven Substanzen in Abhängigkeit vom Cia-System getestet. Die eingesetzten Substanzen führen zur Inhibition der Zellwandbiosynthese auf unterschiedlichen Stufen (siehe Abb. 3.1).

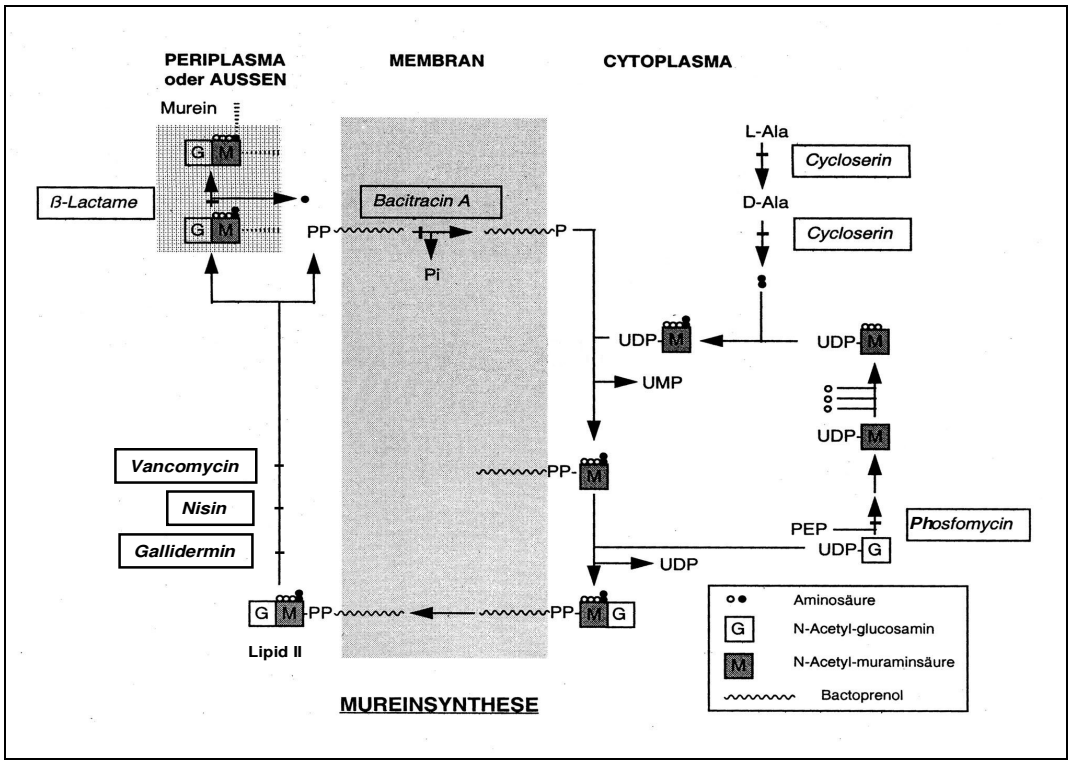



**Abb. 3.1: Zellwand-Biosynthese und –inhibitoren**
Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Zellwandbiosynthese sowie deren Inhibitoren. Ala = Alanin, UDP/UMP = Uridindiphosphat/-monophosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat. Modifiziert nach Wolf (1999).

Phosphomycin und D-Cycloserin wirken als Substratanaloga für Vorstufen der Mureinbiosynthese. Bacitracin verhindert die Dephosphorylierung von Bactoprenol und blockiert damit den Transport der Zellwandbausteine über die Membran. Cefotaxim und Vancomycin inhibieren die Polymerisierungsreaktionen der Zellwand, indem sie die Transpeptidierungsreaktion durch Interaktion mit den PBPs bzw. mit dem D-Ala-D-Ala-Substrat hemmen. Nisin und Gallidermin sind biologisch aktive Substanzen (Lantibiotika), die von einigen Gram-positiven Bakterien produziert werden. Sie binden an das LipidII-Molekül und bilden anschließend Poren in der Zellmembran (Kellner *et al.*, 1988; Wiedemann *et al.*, 2001).
Die untersuchten *S. pneumoniae* Stämme hatten verschiedene Aktivierierungszustände des Cia-Systems. Im Gegensatz zum Wildtyp R6 besitzt der KP3-Stamm die $CiaH_{C306}$ T230P-Mutation, welche zu einer Aktivierung des Cia-Systems führt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2003). Die KP1-Mutante kann aufgrund einer Resistenzkassette in dem *ciaR*-

Gen kein funktionelles Cia-System mehr ausbilden. Somit wurden in diesen Experimenten „ON"- (KP3) und „OFF"- (KP1) Zustände des Cia-Systems miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde der Ausgangsstamm *S. pneumoniae* R6 benutzt.
Die Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika wurde zunächst mit dem Agardiffusions-Test untersucht. Die generierten MHK-Werte (MHK = Minimale Hemmkonzentration) sind in Tab. 3.1 zu sehen.
Die Daten aus Tabelle 3.1 belegen die geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. Die meisten Werte unterscheiden sich nicht über einen Faktor von zwei. Generell lässt sich aber eine Tendenz bei aktiviertem Cia-System (KP3) zu höheren MHK-Werten erkennen. Eine Aktivierung bewirkt eine geringfügig höhere Resistenz in Übereinstimmung mit der Selektion dieser Mutante mit Cefotaxim. Im Gegensatz dazu ist bei inaktiviertem Cia-System (KP1) kein einheitlicher Unterschied zum R6 oder keine einheitliche Tendenz zur Hypersensitivität zu beobachten. Bei Bacitracin und Cefotaxim wurde eine Erhöhung der Sensitivität und bei Cycloserin und Phosphomycin ein Anstieg der Resistenz gemessen.

**Tab. 3.1: Einfluss des Cia-Systems auf die Resistenz gegen Zellwandantibiotika**

| Stamm | Cia-Aktivierungs-zustand | Cefotaxim [µg/ml] | Vancomycin [µg/ml] | Bacitracin [µg/ml] | Cycloserin [µg/ml] | Phosphomycin [µg/ml] | Nisin [µg/ml] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R6 | | 0,02 | 0,55 | 67,5 | 62,5 | 36,5 | 1,3 |
| KP1 | „OFF" | 0,015 | 0,525 | 40 | 115 | 41,5 | 1,35 |
| KP3 | „ON" | 0,04 | 0,75 | 82,5 | 137,5 | 51,5 | 2,1 |

Es sind Mittelwerte von 2 (Nisin) bzw. mindestens 3 unabhängigen MHK-Messungen dargestellt. Dem KP1-Stamm (Cia „OFF") fehlt das Cia-System, in dem KP3-Stamm (Cia „ON") liegt wahrscheinlich eine Aktivierung des Cia-Systems vor. Die Daten wurden mit der Agardiffusions-Methode hergestellt, bei der verdünnte Glycerinkulturen auf verschiedene Antibiotika-Konzentrationen ausgestrichen wurden.

Aufgrund der geringen Unterschiede im Agardiffusions-Test wurden weitere Parameter zur Feststellung der Cia-abhängigen Empfindlichkeit untersucht, nämlich der Einfluß der Antibiotika auf das Wachstum in Flüssigkultur. Zu einer wachsenden Kultur wurde bei Nephelo 20 das Antibiotikum appliziert und die Fähigkeit der Antibiotika zur Induktion der Zelllyse bestimmt. Zusätzlich zu Antibiotika, die die Zellwandbiosynthese inhibieren, wurden auch andere Substanzklassen untersucht, die mit der Integrität der Zellwand und Zellmembran interferieren. Dazu gehören Detergenzien wie Desoxycholat und dem nicht-ionischen Detergenz Triton-X-100. Die Cia-abhängige Resistenz gegen die durch Desoxycholat induzierte Lyse wurde zwar erwähnt, aber nicht detaillierter in Form von Messdaten gezeigt (Giammarinaro *et al.*, 1999). Gallidermin wurde zusätzlich zu dem Lantibiotikum Nisin analysiert, da es eine geringere Aktivität durch Porenbildung hat und weniger das Membranpotential beeinflusst. Als Kontrollen wurden Erythromycin und Norfloxacin (ein Quinolon) mit in die Untersuchungen aufgenommen, die die Proteinbiosynthese bzw. die DNA-Replikation inhibieren.

Alle Wachstumsversuche wurden wie unter 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden bei allen Antibiotika und Substanzen verschiedene Konzentrationen getestet, von denen die mit den deutlichsten Unterschieden hier wiedergegeben sind (siehe Abb. 3.2).
Mit den Substanzen Vancomycin, Bacitracin, Cycloserin, Desoxycholat, Phosphomycin und Triton-X-100 konnte beobachtet werden, dass Zellen ohne Cia-System anfälliger gegenüber induzierter Lyse sind. Im Gegensatz dazu bildete eine Aktivierung des Cia-Systems immer Schutz gegenüber induzierter Lyse aus. Bei Gallidermin sind nur sehr geringe Unterschiede vorhanden. Diese Unterschiede deuten aber auch einen Cia-abhängigen Schutz vor induzierter Lyse an. Generell waren die Konzentrationen, die in den Cia-Mutanten Lyse induzieren ca.

um den Faktor 2 verschieden von den Konzentrationen, die im Wildtyp eine ähnliche Wirkung zeigten. Bei Nisin hingegen zeigte der KP3-Stamm (Cia „ON“) die größte Empfindlichkeit, der R6 die höchste Resistenz. Die Regeneration von Zellen, die mit Nisin oder Gallidermin behandelt wurden, ist ein üblicher Effekt und wurde reproduzierbar beobachtet.
Die nicht lytischen Kontrollsubstanzen Erythromycin und Norfloxacin, die nicht in die Zellwandbiosynthese eingreifen, lassen keinen Unterschied zwischen den Cia-Mutanten erkennen. Dies belegt die Bedeutung des Cia-Systems für den Schutz der Zellen gegenüber Zellwandstress und Stress, welcher an der Membran ansetzt (Triton-X-100 und Desoxycholat).
Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten zeigen, dass die Resistenzeigenschaft des Cia-Systems nicht auf β-Laktam-Antibiotika beschränkt ist, sondern auf weitere Zellwandinhibitoren ausgedehnt werden kann. Die Lyse-Protektion des Cia-Systems ist ebenfalls nicht auf Triton (Giammarinaro *et al.*, 1999) und Piperacillin (Mascher, 2001) begrenzt, sondern zeigt sich hier als generelles Prinzip bei Störungen der Zellwandintegrität unabhängig von den induzierenden Mechanismen. Eine Aktivierung des Cia-Systems führt fast immer zu weniger, eine Inaktivierung zu erhöhter Empfindlichkeit im Vergleich zu den Kontrollen. Warum dieser Effekt bei Nisin nicht beobachtet werden konnte, sondern der R6 am wenigsten empfindlich gegenüber Nisin war, ist unklar.

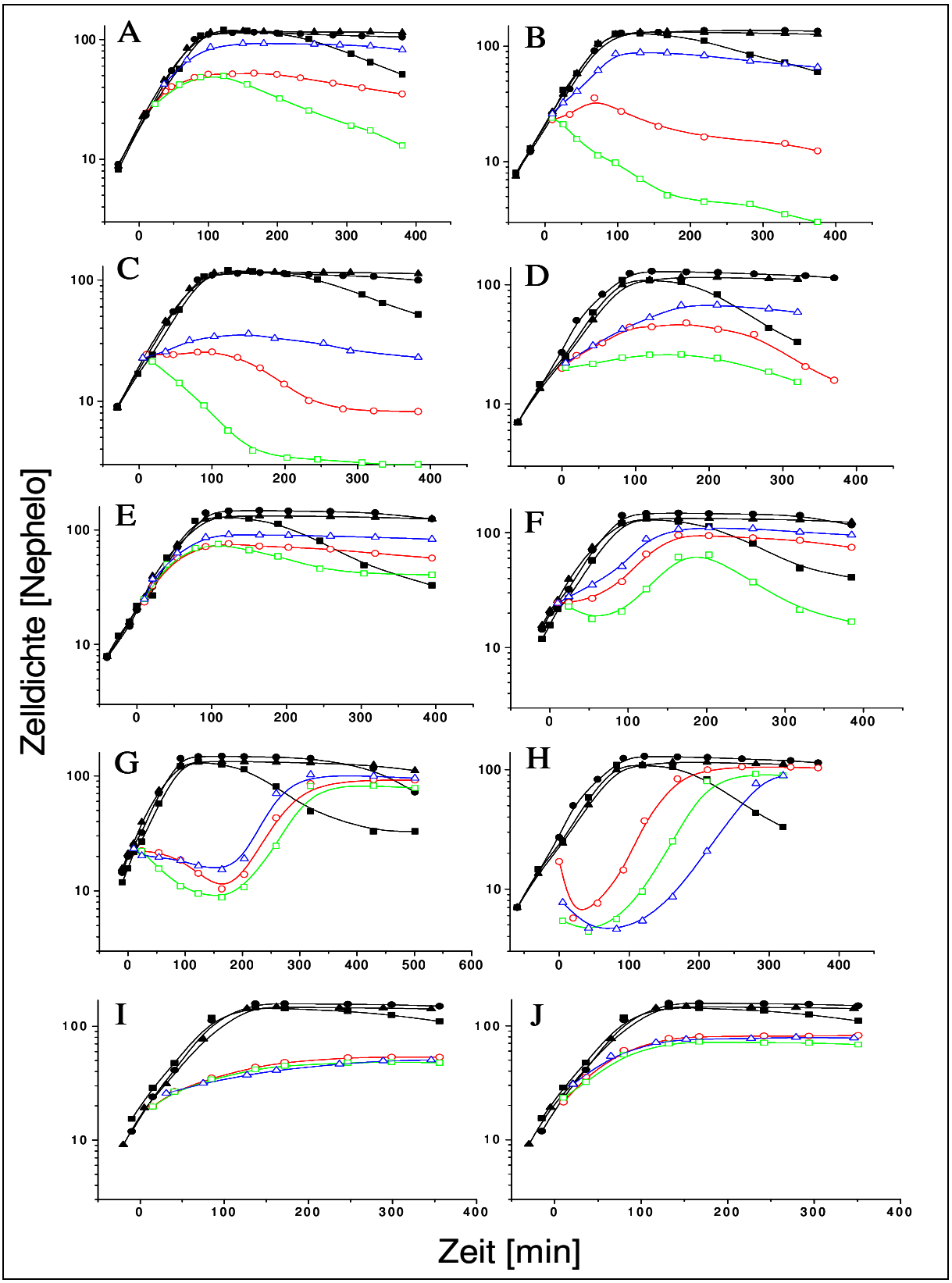



**Abb. 3.2: Einfluss des Cia-Systems auf die Resistenz gegenüber induzierter Zelllyse**
Bei einer wachsenden Kultur wurde ab Nephelo 20 die Zelllyse induziert. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten, auf der Ordinate die Zelldichte in Nephelo angegeben. Der Zeitpunkt 0 repräsentiert die Zelldichte Nephelo 20, bei der alle Zugaben erfolgt sind. Es ist ein repräsentativer Datensatz von mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen abgebildet. Die ausgefüllten schwarzen Symbole zeigen die Kontrollen ohne Zugabe, die offenen farbigen Symbole stellen die Wachstumskurven nach Zugabe der Substanzen dar. R6 ( ○ ), KP1 (Cia „OFF“, □ ), KP3 (Cia „ON“, △ ). A = Vancomycin 0,45 µg/ml, B = Bacitracin 20 µg/ml, C = Cycloserin 50 µg/ml, D = Phosphomycin 90 µg/ml, E = Desoxycholat 150 µg/ml, F = Triton-X-100 0,005%, G = Gallidermin 0,5 µg/ml, H = Nisin 0,4 µg/ml, I = Erythromycin 0,1 µg/ml, J = Norfloxacin 10 µg/ml.

## 3.2 Das Cia-System und PBP-Mutationen

Penicillin-Bindeproteine (PBPs) besitzen enzymatische Aktivität, mit der sie die Polymerisierung der Zellwand durchführen. Mutationen in der Penicillin-Bindedomäne können eine geringere Affinität der PBPs zu den β-Laktam-Antibiotika bewirken. In den spontanresistenten Laborfamilien (Abb. 1.2) treten PBP-Mutationen auf. Die im vorigen Kapitel bereits erwähnte C303-Mutante hat eine CiaH- und zwei PBP2x-Mutationen (siehe auch Abb. 1.2). Durch Inaktivierung des Cia-Systems in C303 wurde eine deutlich geringere Lebensfähigkeit, längere Generationszeit und eine verstärkte Autolyse der Zellen beobachtet (Mascher, 2001). Somit sind die C303-Zellen mit zwei PBP2x-Mutationen auf ein funktionelles Cia-System angewiesen. In C203, in der nur eine PBP-Punktmutation vorhanden ist, sind die Auswirkungen der Inaktivierung des Cia-Systems weniger dramatisch, aber sichtbar. Inwieweit die Folgen der Inaktivierung des Cia-Systems auch mit anderen PBP2x-Mutationen bzw. mit anderen PBP-Mutationen beobachtet werden können, war Fragestellung der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente.
Die Notwendigkeit des Cia-Systems für die Vitalität der Zellen wurde durch Inaktivierung des Cia-Systems mit einer Spektinomycin-Resistenzkassette überprüft. Es war zunächst notwendig, diese auch in den C203 und C303-Hintergrund zu etablieren, da vorherige Versuche von Mascher (2001) auf einer Inaktivierung durch Insertions-Duplikations-Mutagenese zurückzuführen waren. Dafür wurde das *ciaR::aad9*-Fragment aus dem KP1-Stamm herausamplifiziert und in Stämme mit veränderten PBP-Proteinen transferiert. Die C203 und C303-Stämme haben eine bzw. zwei PBP2x-Punktmutationen, die erst nach der Selektion einer CiaH-Mutation in dieser Mutantenfamilie aufgetreten sind (siehe Tabelle 3.2). Weiterhin wurden Stämme verwendet, in denen das *pbp2x* als Mosaikgen aus klinischen resistenten Isolaten vorlag (Serotyp 23F; Bergmann, 2003). Darüberhinaus wurden Mutanten in den anderen hmw-PBPs (PBP2b) mit Mosaikgenstruktur als Empfänger für das *ciaR::aad9*-Fragment benutzt (Chi, 2004). Bei PBP1a, PBP1b und PBP2a konnten keine niedrigaffinen Allele in R6 eingebracht werden, da diese keinen selektionierbaren Phänotyp hervorrufen. Es wurde daher auf Inaktivierungsmutanten in diesen Genen zurückgegriffen (Paik *et al.*, 1999; Rutschmann, 2003); im Gegensatz zu PBP2x und PBP2b sind diese drei anderen PBPs der Klasse A nicht essentiell. Diese „loss-of-function"-Mutanten besitzen, ähnlich wie die PBP2x-Mutationen in R6 nur einen gering ausgeprägten Phänotyp (leicht höhere Generationszeiten). Zusätzlich wurde noch ein Stamm analysiert, in dem mehrere PBPs durch Transformation mit chromosomaler *S. mitis* DNA in niedrigaffine Allele verändert wurden (Hakenbeck *et al.*, 1998).
Alle Transformanten konnten ohne Probleme und in ausreichender Menge erhalten werden. Generell wurden 5 Klone auf ihre Richtigkeit überprüft, von denen ein genetisch richtiger Klon für die weitere Analyse ausgewählt wurde. Die korrekte Insertion der Spektinomycin-Resistenzkassette wurde mit den Primern 4989 und 4991 überrüft.
Die Stämme, bei denen PBP-Proteine inaktiviert wurden, wurden mit Bocillinmarkierung, SDS-PAGE und Fluorometrie überprüft. Das PBP-Profil wurde immer von verschiedenen Klonen von einem Stamm analysiert (Abb. 3.3).

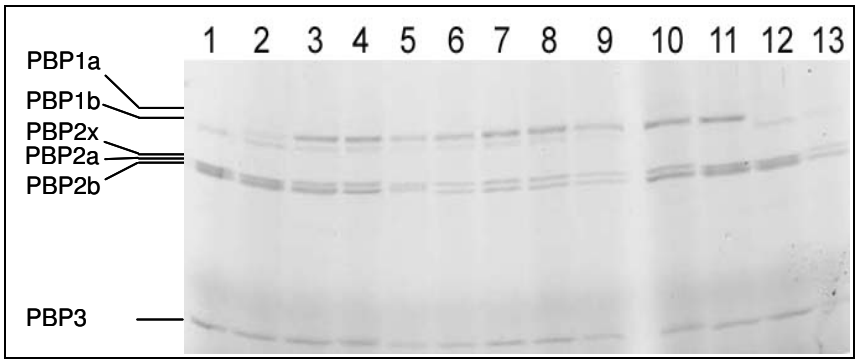



**Abb. 3.3: Profile von Mutanten in verschiedenen PBPs**
Mit Bocillin markiertes Zelllysat von einer Standardprobe (entspricht 1 ml Zellen bei Nephelo 20) wurde mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Fluoreszenz detektiert. Es sind 6 PBPs erkennbar, deren Bandenmuster schematisch dargestellt ist. PBP-Inaktivierungen sind durch fehlende Banden erkennbar. 1 = KP101 (PBP1a), 2 = R6, 3 – 4 = KP115 ($PBP2x_{2349}$, Klon 4, 2), 5 – 6 = KP114 ($PBP2b_{2349}$, Klon 4, 5), 7 – 8 = KP113 (PBP2a, Klon 4, 5), 7 – 9 = KP113 (PBP1b, Klon 4 – 6), 12 – 13 = KP111 (PBP1a, Klon 4, 5)

KP111 fehlt das PBP1a, entsprechend war auch keine PBP1a-Bande in den Spuren 12 und 13 sichtbar (siehe Abb. 3.3). KP112 fehlt das PBP1b (siehe Spuren 10 und 11). Die Abwesenheit des Proteins PBP2a in KP113 sowie die Mosaikblock-enthaltenden PBP2b und PBP2x-Allele ließen sich aufgrund des sehr ähnlichen Laufverhaltens dieser Proteine nicht eindeutig identifizieren. Trotzdem ist zu erkennen, dass bei den Stämmen KP113 (PBP2a), KP114 ($PBP2b_{2349}$) und KP115 ($PBP2x_{2349}$) eines dieser drei Proteine nicht mehr vorhanden war. Als Kontrolle diente der R6, welcher in Spur 2 aufgetragen wurde.
Als Indikator für die Notwendigkeit eines funktionellen Cia-Systems unter den indizierten Bedingungen wurde die Wachstumsfähigkeit der Stämme in CpH8-Medium untersucht. Zusätzlich wurde das Resistenzverhalten gegen Cefotaxim analysiert. In Tabelle 3.2 sind die Charakteristika dieser Stämme aufgelistet.
Die Generationszeiten in Tabelle 3.2 demonstrieren, dass Stämme mit inaktiviertem Cia-System oft eine Erhöhung der Generationszeit aufweisen. Die Unterschiede im Wachstum waren aber in den meisten Fällen nur sehr gering. Nur bei C303, KP111 (PBP1a) und KP113 (PBP2a) wuchsen die Zellen ohne Cia-System dramatisch langsamer: die Generationszeit erhöhte sich durch Inaktivierung des Cia-Systems zu den jeweiligen Ausgangsstämmen bei $C303R^{-}H^{-}$ um 50%, bei KP111 um 34% und bei KP113 um 53%. Kein Unterschied war bei KP104 ($PBP2b_{2349}$) und bei $R6_T$-CCCB durch die Inaktivierung des Cia-Systems zu beobachten.
Die MHK verminderte sich – wenn überhaupt – nur geringfügig, wobei der Unterschied nahe an der Detektionsgrenze liegt. Ausnahmen stellten hier lediglich C203 und C303 dar, deren Resistenzniveau durch Inaktivierung des Cia-Systems deutlich verringert wurde. Das PBP2b-Protein ist an der Ausbildung von Piperacillin-Resistenz, nicht aber an der von Cefotaxim-Resistenz beteiligt (Grebe und Hakenbeck, 1996; Krauß *et al.*, 1996). Deshalb wurden für die Stämme KP104 ($PBP2b_{2349}$) und KP114 die MHK-Werte für Piperacillin bestimmt. Bei diesen war eine Verminderung der MHK-Werte von 0,19 auf 0,125 µg/ml durch Inaktivierung des Cia-Systems erkennbar.

**Tab. 3.2: Generationszeiten und MHK-Werte von Stämmen mit Cia-Inaktivierung**

| Stamm | Merkmale auf DNA- oder Proteinebene | Generationszeit [min] | MHK Cef [µg/ml] |
|---|---|---|---|
| R6 | | 28 | 0,02 |
| KP1 | R6 *ciaR*::*aad9* | 31 | 0,015 |
| C203 | CiaH (A203V), PBP2X (G597D) | 29 | 0,2 |
| C203R$^-$H$^-$ | C203 *ciaR*::*aad9* | 30 | 0,1 |
| C303 | C203 PBP2X (T550A) | 28 | 0,8 |
| C303R$^-$H$^-$ | C303 *ciaR*::*aad9* | 42 | 0,2 |
| KP101 | R6 *pbp1a*::pUC18 | 29 | 0,02 |
| KP111 | KP101 *ciaR*::*aad9* | 39 | 0,015 |
| KP102 | R6 *pbp1b*::pUC18 | 29 | 0,02 |
| KP112 | KP102 *ciaR*::*aad9* | 33 | 0,02 |
| KP103 | R6 *pbp2a*::pJDC9 | 28 | 0,02 |
| KP113 | KP103 *ciaR*::*aad9* | 53 | 0,015 |
| KP104 | R6 $pbp2b_{2349}$ | 28 | 0,02 (0,19)* |
| KP114 | KP104 *ciaR*::*aad9* | 30 | 0,02 (0,125)* |
| KP105 | R6 $pbp2x_{2349}$ | 28 | 0,45 |
| KP115 | KP105 *ciaR*::*aad9* | 28 | 0,4 |
| $R6_T$-CCCB | R6 $pbp1a_{S.mitis}$, $pbp1b_{S.mitis}$, $pbp2a_{S.mitis}$, $pbp2b_{S.mitis}$, $pbp2x_{S.mitis}$ | 35 | 55 |
| KP116 | $R6_T$-CCCB *ciaR*::*aad9* | 35 | 55 |

Dargestellt sind die Mutanten in verschiedenen PBPs und inaktiviertem Cia-System. Die Generationszeiten beziehen sich auf eine repräsentative von zwei unabhängigen Messungen. Die MHK-Werte (Minimale Hemmkonzentration) wurden mit Cefotaxim erzielt. Für die Bestimmung der MHK wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt, von denen hier die Mittelwerte wiedergegeben sind. 2349 stellt einen Mosaikblock des indizierten Gens aus dem resistenten klininschen Isolat *S. pneumoniae* 2349 dar. *Diese MHK-Werte beziehen sich auf Piperacillin.

Es ist beschrieben, dass in C203 ein geringer und in C303 ein starker Effekt auf die stationäre Phase sowie das autolytische Verhalten durch Inaktivierung des Cia-Systems auftritt (Mascher, 2001). Daher wurde hier zusätzlich zu den Generationszeiten das Verhalten in der stationären Phase dokumentiert (Abb. 3.4).

Eine deutlich verkürzte Stationärphase und früh einsetzende Autolyse war nicht nur wie erwartet bei C303R$^-$H$^-$ (Abb. 3.4 B), sondern auch bei Fehlen des Cia-Systems und des PBP2a- (Abb. 3.4 E) sowie mit dem PBP2x$_{2349}$-Protein (Abb. 3.4 G) zu erkennen. Bei C303 und mit PBP2x$_{2349}$ war keine, mit deletiertem PBP2a eine Stationärphase von ca. einer Stunde zu erkennen. Direkt anschließend folgte die Autolyse. Auffällig ist, dass die beiden PBP2x-Mutanten C303 und KP105 (PBP2x$_{2349}$) unterschiedlich durch die Cia-Inaktivierung beeinträchtigt wurden. In beiden Stämmen entsteht zwar eine verstärkte Autolyse, aber die Generationszeiten waren in C303R$^-$H$^-$ wesentlich länger, und in KP115 (PBP2x$_{2349}$) identisch zum Ausgangsstamm.

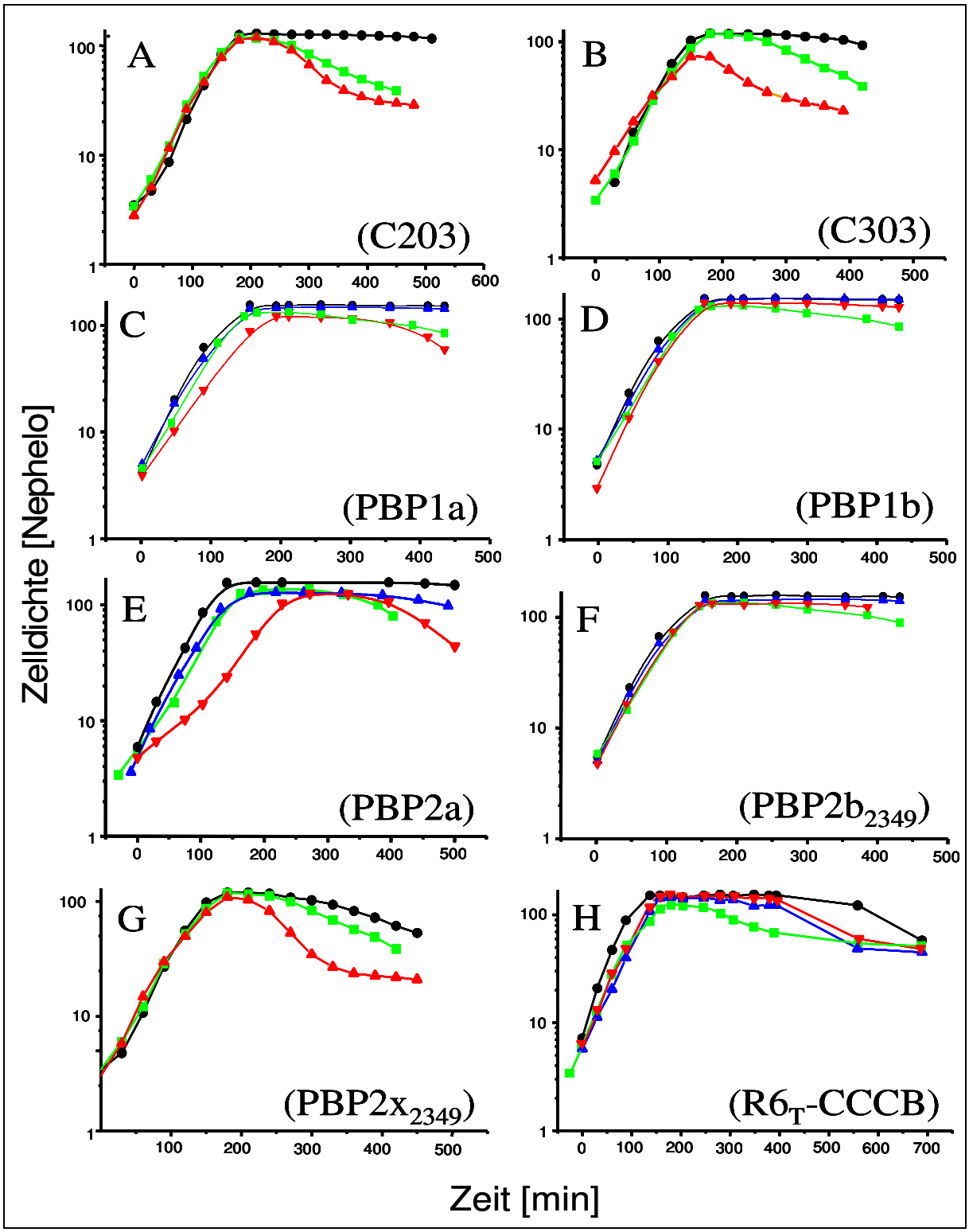



**Abb. 3.4: Einfluss der Inaktivierung des Cia-Systems auf die stationäre Phase und die Autolyse in PBP-Mutanten**

Abgebildet ist das Wachstum von Stämmen mit PBP-Mutationen und den gleichen Stämmen ohne Cia-System. Eine logarithmisch wachsende Vorkultur wurde 1:40 verdünnt und das Wachstum durch Nephelometrie verfolgt. Rot ist immer der Stamm mit PBP-Mutationen und inaktiviertem Cia-System. Grün ist immer KP1 (Cia „OFF"). Die Abszisse stellt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Zelldichte in Nephelo dar. A = C203 ( ● ), KP1 ( ■ ), C203R$^{-}$H$^{-}$ ( ▲ ); B = C303 ( ● ), KP1 ( ■ ), C303R$^{-}$H$^{-}$ ( ▲ ); C = R6 ( ● ), KP101 ( ▲ ), KP1 ( ■ ), KP111 ( ▼ ); D = R6 ( ● ), KP102 ( ▲ ), KP1 ( ■ ), KP112 ( ▼ ); E = R6 ( ● ), KP103 ( ▲ ), KP1 ( ■ ), KP113 ( ▼ ); F = R6 ( ● ), KP104 ( ▲ ), KP1 ( ■ ), KP114 ( ▼ ); G = KP105 ( ● ), KP1 ( ■ ), KP115 ( ▲ ); H = R6 ( ● ), R6$_T$-CCCB ( ▲ ), KP1 ( ■ ), KP116 ( ▼ ).

Kein Unterschied zum Ausgangsstamm konnte bei $R6_T$-CCCB in Generationszeit, stationärer Phase, MHK oder Zellform identifiziert werden. Bei KP102 (PBP1b) und KP104 ($PBP2b_{2349}$) war nur eine geringfügige Erhöhung der Generationszeit durch Inaktivierung des Cia-Systems feststellbar. Bei den Stämmen C203, C303, KP101 (PBP1a), KP103 (PBP2a) und KP105 ($PBP2x_{2349}$) führte die Inaktivierung des Cia-Systems zu großen phänotypischen Veränderungen (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.4).
Diese Daten belegen, dass erstens Mutationen nicht nur in PBP2x, sondern auch in PBP2a Veränderungen für die Zelle bedeuten. Zweitens haben verschiedene Mutationen im PBP2x-Protein unterschiedlich starke Auswirkungen. Drittens müssen diese Auswirkungen wahrscheinlich durch andere Systeme kompensiert werden. Möglicherweise stellt das Cia-System ein solches kompensatorisches System dar, weil diese Auswirkungen erst nach Deletion des Cia-Systems zu Wachstumsstörungen führen.

## 3.3 Aktivierung des Cia-Systems durch PBP2x-Mutationen

Das Cia-System wurde als Resistenzdeterminante in spontanresistenten Labormutanten, die mit spezifischen Konzentrationen von Cefotaxim selektioniert wurden (siehe Abb. 1.2), entdeckt und in der ersten Selektionsstufe der C003- und C004-Familien identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994; Zähner *et al.*, 1996). In diesen Familien geht die Kompetenz erst in der dritten Selektionsstufe verloren. Im Gegensatz zu dem $CiaH_{C306}$-Allel, das als „ON"-Mutante zu einer kompletten Unterdrückung der Kompetenz führt, sind Zellen mit dem $CiaH_{C103}$-Allel fast genauso kompetent wie der Wildtyp. Allerdings bewirkt die Kombination von $CiaH_{C103}$ und PBP2x-Mutationen eine Inhibierung der Kompetenz. Daraus wurde geschlossen, dass das Cia-System durch PBP2x-Mutationen aktiviert werden kann. Die Aktivierbarkeit des Cia-Systems durch PBP-Mutationen wurde in den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten untersucht. Die Experimente sind als Ergänzung zu denen in Kapitel 3.8 zu sehen, da teilweise die gleichen Stämme und ihre Transkriptomeigenschaften untersucht wurden.
Anhand der Transkription der Cia-Zielgene *htrA* (*spr2045*) und *spr0931* wurde die Aktivierung des Cia-Systems überprüft. Diese Gene wurden ausgewählt, da beide zum minimalen Cia-Regulon gehören und stark Cia-abhängig transkribiert werden (Mascher *et al.*, 2003; Kapitel 3.7.2). Als Methode diente die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), welche spezifisch mRNA-Transkripte relativ quantifizieren kann. Die Quantifizierung wurde gegen die Anwesenheit von 16S-rRNA-Transkripten normalisiert. Als Referenzstämme wurden KP1 (Cia „OFF") und KP3 (Cia „ON") ausgewählt, bei denen eine Inhibition bzw. Aktivierung des Cia-Systems vorhanden ist. KP105 ($PBP2x_{2349}$) und $R6_{pbp2x}^{C303}$ besitzen nur PBP2x-Mutationen aber keine Cia-Mutationen und dienten daher als Kontrollen. KP105 weist einen PBP2x-Mosaikblock aus dem hochresistenten klinischen Isolat 2349 auf (23F-Serotyp, Bergmann, 2003), $R6_{pbp2x}^{C303}$ hat zwei Punktmutationen im PBP2x-Protein (G597D und T550A). Im Vergleich zu dem C103-Stamm, der nur die CiaH A203V-Mutation hat, sollte untersucht werden, ob der C303-Stamm einen Unterschied in der Aktivierung des Cia-Systems durch die zusätzlichen PBP2x-Mutationen zeigt. Alle Transkriptionsdaten sind als relative Werte zu dem R6 dargestellt, d.h. die R6-Transkription ist *per definitionem* als 1 festgelegt (siehe Abb. 3.5).

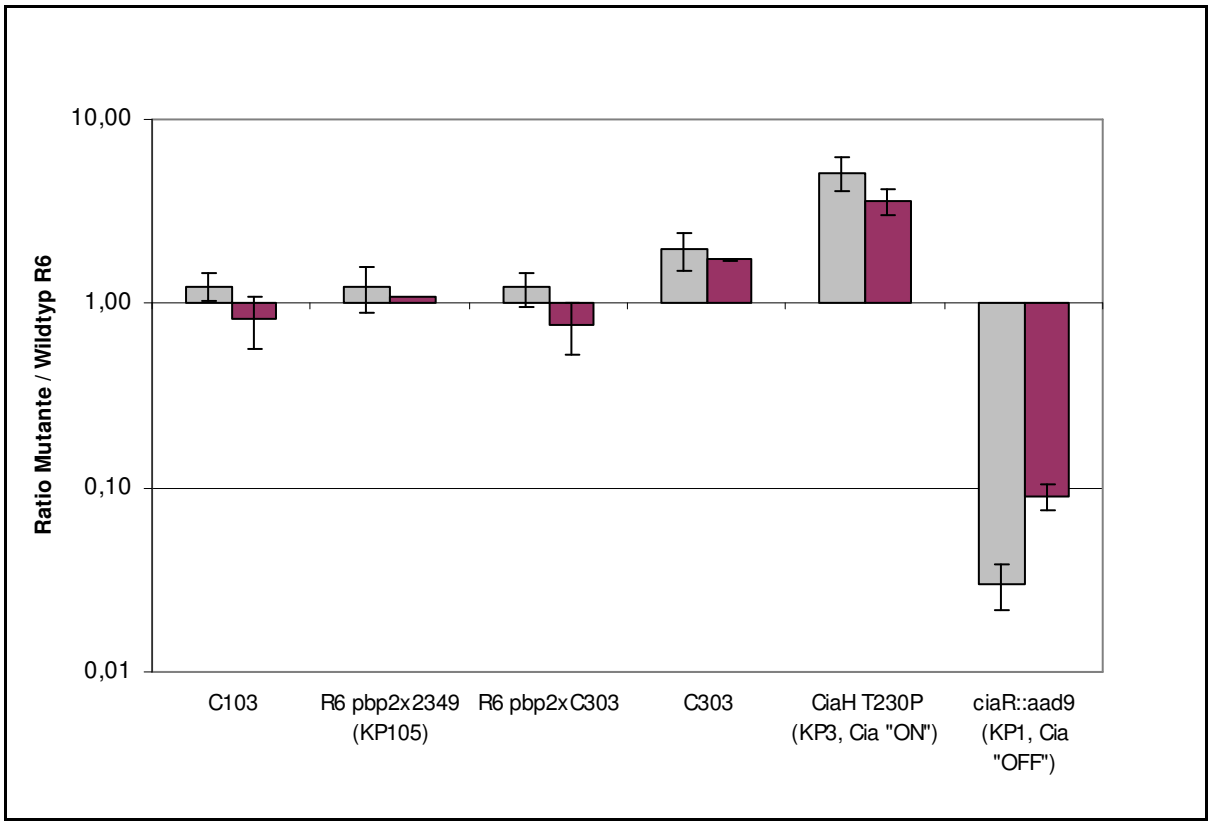



**Abb. 3.5: Relative Transkription der *htrA*- und *spr0931*-Gene in Abhängigkeit von Cia- und PBP-Mutationen**

Gemessen wurde die mRNA Quantität der *spr0931* und dem *htrA* (*spr2045*)-Gene. Gezeigt sind die Verhältnisse zwischen dem jeweiligen Stamm und dem Wildtyp R6. Grau sind die Werte für das *htrA*-Gen, rot die für das *spr0931*-Gen. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung der gemessenen Werte. Dargestellt sind Mittelwerte. Es wurden zwei unabhängige Kulturen untersucht.

Abb. 3.5 zeigt die relative Transkription des *htrA*- (*spr2045*) und des *spr0931*-Gens in den verschiedenen Stämmen zum Wildtyp R6. Die Transkription in den Stämmen C103, KP105 und $R6_{pbp2x}^{C303}$ war nicht verändert und befand sich auf dem Referenzniveau. Die CiaH A203V Mutation in C103 bewirkte keine Aktivierung des Cia-Systems. Erst durch die Kombination von CiaH- und PBP2x-Mutationen wurde das Cia-System aktiviert. Dieses ist durch die erhöhte Transkription in C303 erkennbar (siehe Abb. 3.5).
Die Transkriptionswerte aus den Mikroarrayanalysen, die in Kapitel 3.8 vorgestellt werden, sind fast mit diesen RT-PCR-Daten identisch. Lediglich bei C103 variierte die *spr0931*-Transkription um einen Faktor von 2 (RT-PCR = 0,83, Mikroarray = 2,13).
Diese Daten zeigen, dass das Cia-System durch PBP2x-Mutationen aktiviert werden kann. Trotzdem ist diese Transkription nicht auf dem Niveau, welches das $CiaH_{C306}$ T230P-Allel vermittelte (siehe Kapitel 3.7.2, Tabelle 3.15). PBP2x-Mutationen können anscheinend nur ein zur Aktivierung prädestiniertes CiaH-Allel aktivieren, während das CiaH-Wildtyp-Allel nicht auf die Anwesenheit von PBP-Mutationen reagiert hat.

## 3.4 Mögliche Schlüsselenzyme für Cia-verwandte Phänotypen

Das Cia-System ist offenbar an vielen Eigenschaften von *S. pneumoniae* beteiligt. So beeinflusst die Inaktivierung des Cia-Systems die Kompetenz, die Virulenz und die Resistenz (Guenzi *et al.*, 1994; Throup *et al.*, 2000). Weiterhin induziert die Inaktivierung des Cia-Systems ein langsameres Wachstum und eine stärkere Autolyse. Die Gene des minimalen Cia-Regulons sind im Kapitel 1.3 (Tabelle 1.1) aufgeführt. Welche von diesen regulierten Genen aber die Effekte des Cia-Systems verursachen, ist nicht verstanden. Dabei sind die Autolyse und die Resistenz möglicherweise primär, die Virulenz und die Kompetenz wahrscheinlich nur sekundär durch Funktionen von Cia-regulierten Genen verursacht. Um einen ersten Schritt zur funktionellen Charakterisierung der durch das Cia-System regulierten Gene (Cia-Zielgene) zu unternehmen, wurden sechs Einzelgene, die anhand der Stärke der Cia-Regulation oder der möglichen Funktion der Zielgene ausgewählt wurden, inaktiviert. Dazu wurde entweder nur das Gen bzw. zusätzlich die Promotorregionen der regulierten Operons durch eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermAM*, Martin *et al.*, 1987; Lunsford und London, 1996) inaktiviert und z.T. ersetzt. Die so konstruierten Stämme wurden phänotypisch auf das Vorhandensein von Cia-Effekten untersucht. Dabei wurden leicht messbare Eigenschaften getestet: Generationszeit, Lyse, Suszeptibilität gegenüber Antibiotika und Kompetenz.

Die Cia-Zielgene wurden einerseits im Wildtyp R6 und andererseits in dem KP3-Stamm (Cia „ON“) inaktiviert, der durch die CiaH T230P-Mutation eine komplette Kompetenzdefizienz aufweist. Diese Konstrukte sollten klären, ob die inaktivierten Gene an der Inhibierung der Kompetenz beteiligt sind. Der Vorteil der Inaktivierung in diesem genetischen Hintergrund liegt in der Ja-oder-Nein-Antwort, die dieses Experiment liefert. Da der KP3-Stamm nicht mehr transformierbar ist, sind entweder alle in diesem genetischen Hintergrund konstruierten Stämme auch nicht transformierbar (Nein-Antwort) oder sie sind transformierbar (Ja-Antwort).

Unter den inaktivierten Cia-regulierten Genen sind vier Genloci, die aufgrund ihrer starken Cia-Regulation ausgewählt wurden. Diese vier Gene sind *htrA*, *spr0782* und *spr0931* und das *mal*-Operon. Das *htrA*-Gen (*spr2045*) wird zusammen mit dem *spo0J*-Gen (*spr2046*) transkribiert. Sie wiesen die stärkste Cia-Regulation mit z.T. 80-fachem Transkriptionsunterschied auf (siehe Tabelle 3.15). *Spr0782* und *spr0931* werden monocistronisch transkribiert. Sie zeigten eine 5 – 10-fache Cia-abhängige Transkription. Zwei der sieben *mal*-Gene (*malPM*) zeigten eine 5 – fache Regulation durch das Cia-System (Halfmann, 2004; Tab. 3.15, diese Arbeit). Das *dlt*-Operon (*spr1979 – spr1982*) wurde wegen der Funktion der Genprodukte an der Zellwandbiosynthese ausgewählt. Die *man*-Gene (*spr0259 – spr0261*) stellen ein Zucker-spezifisches PTS-System dar. Sie wurden aufgrund der zentralen Rolle ihrer Genprodukte in der Katabolitrepression (Chaillou *et al.*, 2001) sowie der pleiotropen Effekte auf die Zelloberfläche (Brochu *et al.*, 1993; Lapointe *et al.*, 1993) inaktiviert. Außerdem scheinen die *man*-Gene in der Cia-abhängigen Regulation eine Sonderstellung einzunehmen, da sie entgegengesetzt zu allen anderen Genen des minimalen Cia-Regulons reguliert werden. In den folgenden Abschnitten werden diese Genloci kurz vorgestellt.

Die Gene *manLMN* (*spr0259 – spr0261*) kodieren für die Kohlenhydrat-spezifischen Enzyme II eines Phosphoenolpyruvat:Kohlenhydrat Phosphotransferase System (PTS), bestehend aus den Proteinkomponenten IIAB (*manL*), IIC (*manM*) und IID (*manN*). PTS-Systeme transportieren Zuckersubstrate, welche sie begleitend phosphorylieren. Die *manLMN*-Gene werden als Operon transkribiert. Die Erythromycin-Resistenzkassette wurde

so platziert, dass der Promotor und die ersten 386 Basen des *manN*-Gens ausgetauscht wurden (siehe Abb. 3.6).

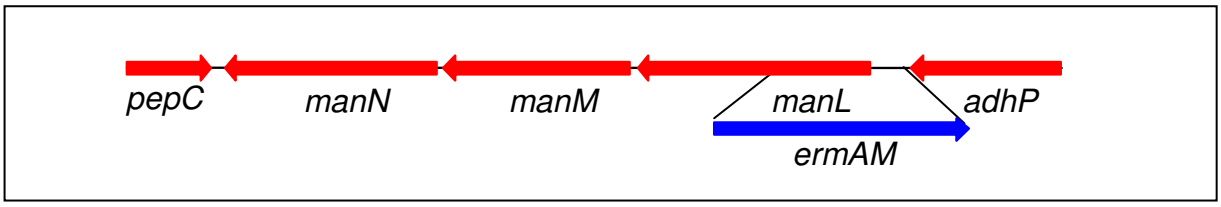



**Abb. 3.6: Die Genregion von *spr0258* bis *spr0262*.**
Dargestellt sind die Genregion der *manLMN*-Gene sowie die Platzierung der *ermAM*-Kassette. Die Gene *manLMN* werden vermutlich als Operon transkribiert.

Das Gen *spr0782* hat keine Homologie zu Genen mit bekannter Funktion. Das Gen wird als monocistronische RNA transkribiert. Es wurden die Basen 0 bis 360 des 433-bp-langen Gens gegen die *ermAM*-Kassette ausgetauscht (siehe Abb. 3.7). Dabei orientiert sich diese Annotation des *spr0782*-Gens nicht an der offiziellen R6-Annotation, sondern stützt sich auf experimentelle Arbeiten zur Transkriptionsstartbestimmung (persönliche Mitteilung, M. Kovacs).

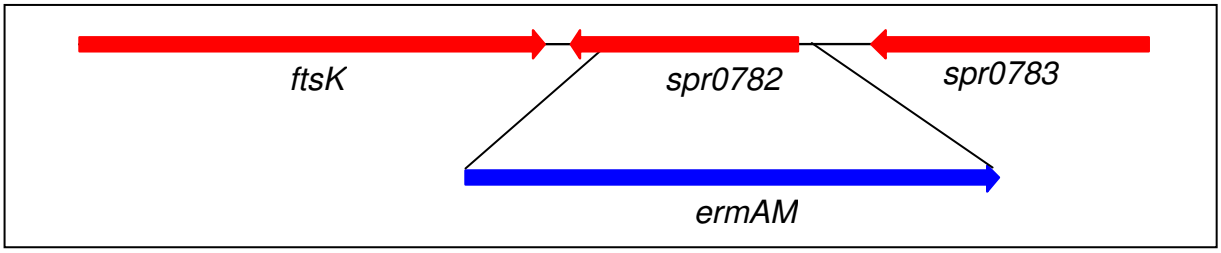



**Abb. 3.7: Die Genregion von *spr0782***
Dargestellt sind die Genregion von *spr0782* und die Platzierung der *ermAM*-Kassette.

Das Protein, welches durch das *spr0931* Gen kodiert ist, besitzt ein Signalpeptid. Eine Funktion konnte dem Protein nicht zugewiesen werden. Das Gen *spr0931* wird wahrscheinlich als monocistronische RNA transkribiert. Es wurden die Basen von 373 bis 505 des 975-bp-langen Gens durch die *ermAM*-Kassette deletiert (siehe Abb. 3.8).

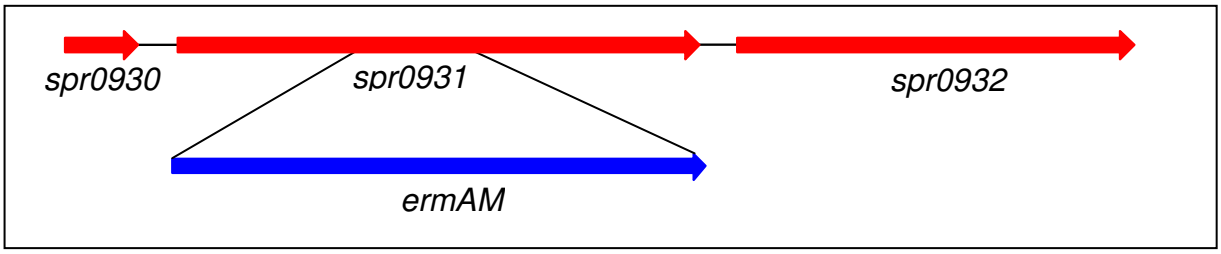



**Abb. 3.8: Die Genregion des Gens *spr0931***
Dargestellt sind die Genregion von *spr0931* und die Position der *ermAM*-Kassette.

Die Gene *malPMXCDAR* sind in drei Operons organisiert: *malXCD*, deren Produkte in der Aufnahme von Maltotetrose involviert sind, *malMP*, die für Enzyme kodieren, die im Metabolismus von Maltosacchariden involviert sind (MalM = Amylomaltase, MalP = Maltodextrin Phosphorylase) und *malAR*, deren Produkte in der globalen Regulation der *mal*-Operons teilnehmen (Nieto *et al.*, 1997). In Abb. 3.9 sind die Genregion der *mal*-Gene und die Konstruktion der Inaktivierung durch die *ermAM*-Resistenzkassette dargestellt. Es wurden jeweils die ersten 516 Basen des *malM*-Gens und des *malX*-Gens inklusive der Promotoren vor dem *malM*- und dem *malX*-Gen entfernt.

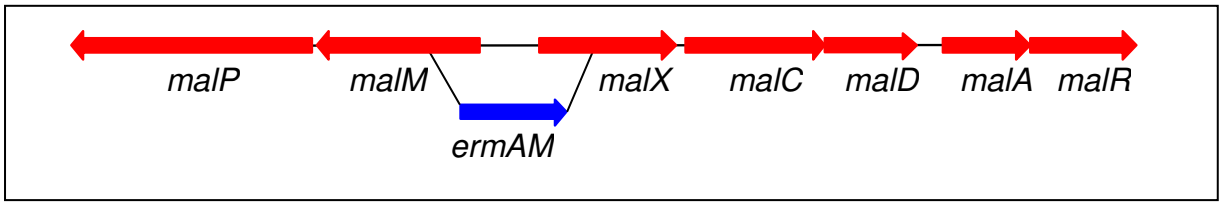



**Abb. 3.9: Die Genregion von *spr1916* bis *spr1922*, die die Gene *malPMXCDAR* enthält.**
Die Abb. zeigt die Genregion der *mal*-Gene sowie die Lokalisation der *ermAM*-Kassette. Es werden drei polycistronische mRNAs von den Promotoren vor *malM*, *malX* und *malA* hergestellt.

Das *dlt*-Operon kodiert für vier Proteine, welche die Alanylierung der Lipoteichonsäuren (LTA) katalysieren. D-Alanin wird an das DltA-Protein gebunden und auf das Carrierprotein Dcp (Genprodukt von *dltC*) übertragen. DltB stellt ein Transportprotein in der Membran dar. DltD ist ein Membranprotein auf der cytosolischen Seite der Membran (Neuhaus und Baddiley, 2003). In Abb. 3.10 sind die Genregion der *dlt*-Gene und die Inaktivierung des *dltA*-Gens aufgezeichnet. Der Promotor des *dlt*-Operons ist nicht entfernt. Der Transkriptionsstart liegt 218 Basen vor dem Translationsstart von DltA (pers. Mitteilung M. Kovacs). Es wurden 245 Basen des *dltA*-Gens deletiert.

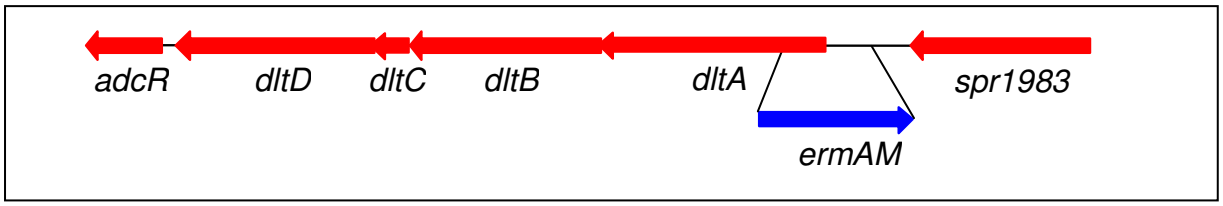



**Abb. 3.10: Das *dlt*-Operon und die Inaktivierung durch die *ermAM*-Kassette**
Die Abb. zeigt die Genregion der *dlt*-Gene sowie die Konstruktion der Inaktivierung des *dltA*-Gens.

Das *htrA*-Gen (*spr2045*) kodiert für einen Virulenzfaktor in *S. pneumoniae*, welcher eine Hitzeschock induzierte Serinprotease darstellt. Das Gen bildet ein Operon mit dem *spo0J*-Gen, welches auch *parB* genannt wird (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2005) und möglicherweise für die Chromosomensegregation verantwortlich ist (Lin und Grossman, 1998). Es wurden die ersten 628 Basen des *htrA*-Gens zusammen mit dem Promotor entfernt (siehe Abb. 3.11).

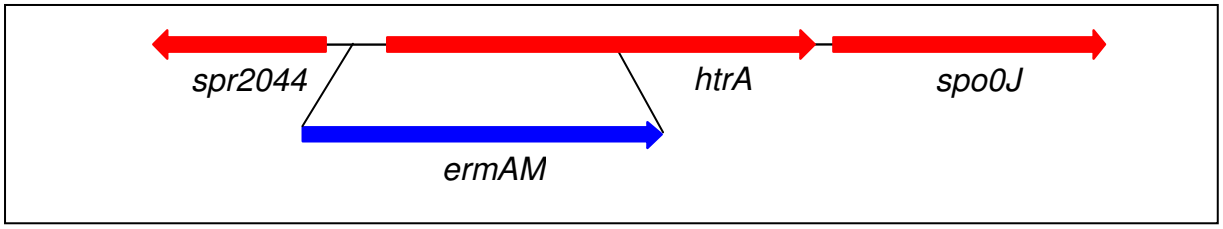



**Abb. 3.11: Das *htrA-spo0J*-Operon mit deletiertem Bereich**
Die Abb. zeigt die Genregion der *htrA / spo0J*-Gene sowie die Positionierung der ermAM-Kessette zur Inaktivierung dieser Gene.

Die *ermAM*-Kassette hat einen konstitutiven Promotor (Martin *et al.*, 1987). Es konnte aber keine Terminatorstruktur erkannt werden, so dass wahrscheinlich die Transkription von stromabwärts liegenden Genen verändert sein könnte. Polare Effekte würden wahrscheinlich besonders bei *htrA* durch Transkriptionsänderung von *spo0J* als morphologische Aberrationen in Erscheinung treten, da Spo0J möglicherweise an der Zellteilung beteiligt ist. Mikroskopische Untersuchungen haben aber keine Änderung an Zellform oder Kettenlänge erkennen lassen (siehe Abb. 3.12). Diese Beobachtung gilt ebenso für die fünf weiteren Stämme, mit den anderen Inaktivierungen (Mikroskopische Aufnahmen nicht gezeigt).

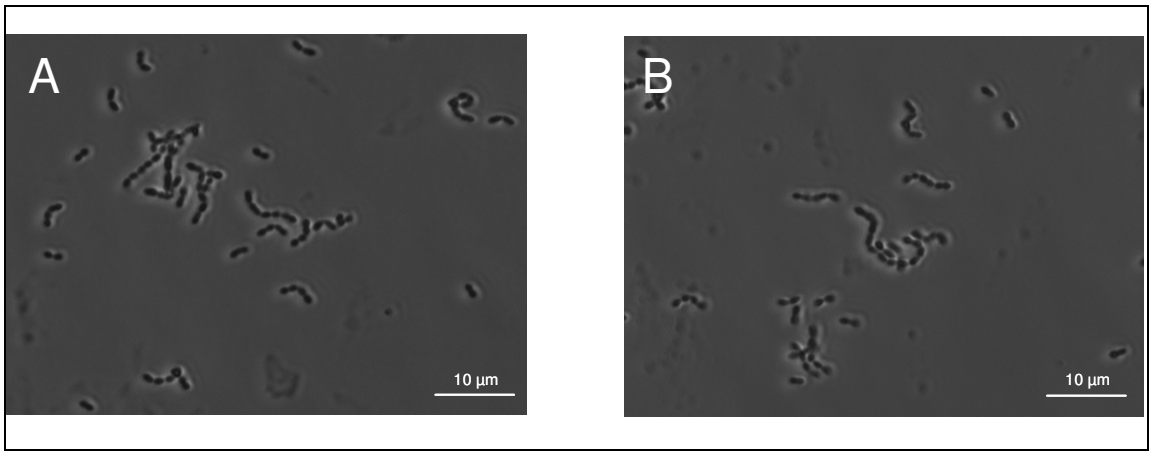



**Abb. 3.12: Mikroskopische Aufnahmen von R6 und der Inaktivierung von *htrA***
Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von *S. pneumoniae* R6 und dem Stamm mit der *htrA*-Inaktivierung. Beide Stämme befanden sich zum Zeitpunkt der Aufnahme in der logarithmischen Wachstumsphase zwischen Nephelo 40 und 60. Vergrößerung: 1000 x. A = R6, B = KP206 (*htrA*::*ermAM*)

Alle Stämme konnten ohne Probleme generiert werden. Generell wurden 5 Klone von einem Stamm überprüft. Sofern keine Wachstumsunterschiede vorhanden waren, wurden alle weiteren Experimente mit einem dieser 5 Klone durchgeführt.
Die erzielten Mutanten wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung überprüft. Die PCR-Überprüfung ist in Abb. 3.13 abgebildet und die dazugehörigen Fragmentgrößen dieser Überprüfung sind in Tab. 3.3 angegeben.

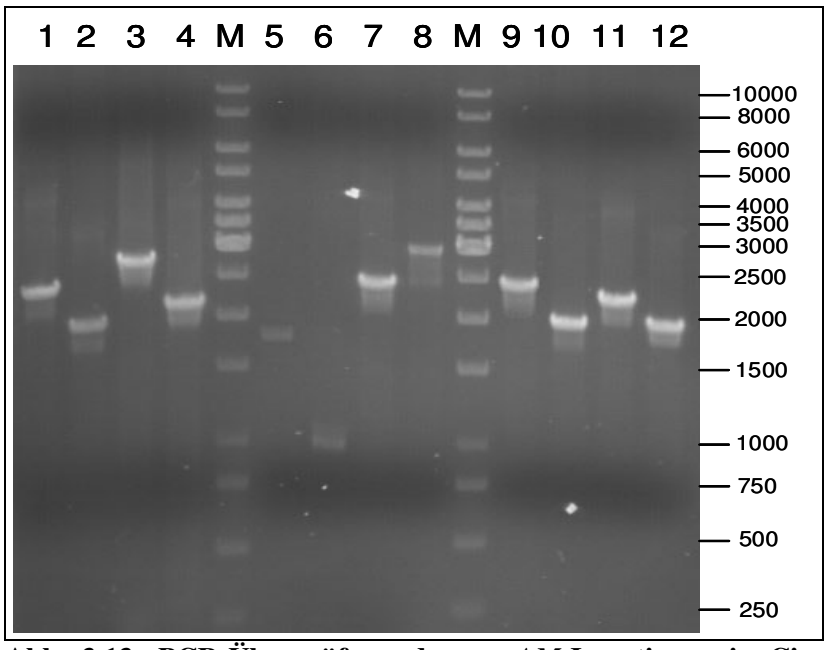



**Abb. 3.13: PCR-Überprüfung der *ermAM*-Insertionen in Cia-Zielgenen.**
Ungerade Nummern stellen die Überprüfung der Insertion, gerade Nummern die Wildtypsituation dar. 1,2 = *manLMN*, 3,4 = *spr0782*, 5,6 = *spr0931*, 7,8 = *mal*-Gene, 9,10 = *dlt*-Gene, 11,12 = *htrA*/*spo0J*, M = Größenstandard. Die Fragmentgrößen des Standards sind als Basenpaarangaben genannt. Die Information zu der Spurennummer ist in Tab. 3.3 wiedergegeben.

**Tab. 3.3: Errechnete Fragmentgrößen bei Inaktivierung der Cia-Zielgene**

| Inaktivierte Gene | Primerkombination | Erwartete Fragmentgröße mit Insertion [bp] | Erwartete Fragmentgröße ohne Insertion [bp] | Indizierte Nummer in Abb. 3.13 |
|---|---|---|---|---|
| *manLMN* | A_261_for / B_261_rev | 2392 | 1934 | 1, 2 |
| *spr0782* | 782_A_for / 782_B_rev | 2756 | 2135 | 3, 4 |
| *spr0931* | 931_A_for / 931_B_rev | 1819 | 981 | 5, 6 |
| *malPMXCDAR* | mal_A_for / mal_B_rev | 2480 | 3011 | 7, 8 |
| *dltABCD* | 1982_A_for / 1982_B_rev | 2472 | 1993 | 9, 10 |
| *htrA/spo0J* | htrA_A_for / htrA_B_rev | 2298 | 2033 | 11, 12 |

Die Primersequenzen sind in Tabelle 2.7 ersichtlich. Die Nummern aus Spalte fünf beziehen sich auf die Spuren in Abb. 3.13.

Wie eingangs schon erwähnt, sind diese sechs Zielloci Cia-reguliert. Ob einer dieser Loci für die Cia-Effekte verantwortlich ist, sollte durch Inaktivierung dieser Zielgene herausgefunden werden. Als Untersuchungskriterium wurde die Generationszeit, MHK für Cefotaxim, die Transformierbarkeit und die induzierte Lyse durch Vancomycin analysiert. Die Werte für die Generationszeit und die MHK sind in Tab. 3.4 angegeben. Die Generationszeit bezieht sich auf eine repräsentative Wachstumsreihe, bei der alle Stämme im gleichen Medium und zur gleichen Zeit gemessen worden sind.

**Tab. 3.4: Generationszeit und Empfindlichkeit gegen Cefotaxim von Stämmen mit inaktivierten Cia-Zielgenen**

| Stamm | von R6 abweichende Merkmale | Inaktivierte Gene | Generationszeit [min] | MHK Cef [µg/ml] |
|---|---|---|---|---|
| R6 | | | 33 | 0,02 |
| KP1 | *ciaR::aad9* | *ciaRH* | 35 | 0,015 |
| KP3 | $ciaH_{C306}$ C688A (Cia „ON“) | | 33 | 0,045 |
| KP201 | *spr261::ermAM* | *manLMN* | 45 | 0,02 |
| KP202 | *spr782::ermAM* | *spr0782* | 39 | 0,02 |
| KP203 | *spr931::ermAM* | *spr0931* | 40 | 0,02 |
| KP204 | *spr1917::ermAM* | *malPM* | 47 | 0,02 |
| KP205 | *spr1982::ermAM* | *dltABCD* | 40 | 0,025 |
| KP206 | *spr2045::ermAM* | *htrA/spo0J* | 35 | 0,025 |
| KP211 | KP3 (Cia „ON“) *spr261::ermAM* | *manLMN* | 46 | 0,04 |
| KP212 | KP3 (Cia „ON“) *spr782::ermAM* | *spr0782* | 40 | 0,04 |
| KP213 | KP3 (Cia „ON“) *spr931::ermAM* | *spr0931* | 41 | 0,045 |
| KP214 | KP3 (Cia „ON“) *spr1917::ermAM* | *malPM* | 48 | 0,045 |
| KP215 | KP3 (Cia „ON“) *spr1982::ermAM* | *dltABCD* | 40 | 0,04 |
| KP216 | KP3 (Cia „ON“) *spr2045::ermAM* | *htrA/spo0J* | 37 | 0,045 |

Dargestellt sind die Stämme mit Inaktivierungen in Genen, die Cia-reguliert sind. Die MHK für Cefotaxim wurde mit dem Agardiffusions-Test durchgeführt. Die Generationszeiten beziehen sich auf das Wachstum in CpH8-Medium. Alle Werte wurden zweifach unabhängig voneinander bestimmt. Für die MHK-Werte sind Mittelwerte angegeben. Für die Generationszeiten wurde ein repräsentativer Datensatz ausgewählt.

Es ist deutlich erkennbar, dass fast alle in dieser Arbeit konstruierten Stämme langsamer wuchsen als die Vergleichsstämme R6, KP1 (Cia „OFF“) und KP3 (Cia „ON“). Die Stämme KP201 und KP211 (*man*-Gene) bzw. KP204 und KP214 (*mal*-Gene) wuchsen wiederum entschieden langsamer als die anderen Stämme mit Generationszeiten von 45 und 46 bzw. 47 und 48 Minuten. Es fällt auf, dass die Stämme, deren Wachstum verlangsamt war, defizitär in Proteinen sind, deren Funktionen Zuckeraufnahme bzw. Zuckerverwertung ist. Die Gene *spr0261 – spr0259* kodieren für ein Mannose-PTS, die Gene *spr1916 – spr1922* für Maltose-Verwertungsproteine. Möglicherweise waren durch die Inaktivierung neben dem Zuckertransport bzw. –metabolismus auch regulatorische Funktionen zerstört worden, die die

Transkription von anderen Zuckerverwertungsgenen koordinieren und so das Wachstum behindern.
Die Resistenz gegenüber Cefotaxim scheint durch Inaktivierung der vorgestellten Gene nicht beeinflusst zu sein (Tab. 3.4). Die Unterschiede der entsprechenden MHK-Werte befanden sich im allgemeinen Schwankungsniveau.
Als weiteres Kriterium für die Cia-Effekte wurde eine Analyse der Transformierbarkeit durchgeführt. Im Vergleich mit R6 ist die Transformierbarkeit der KP1-Mutante (Cia „OFF“) in CpH8-Medium leicht erhöht, in THB-Medium deutlich erhöht (Merai, 2003).
Während die Inaktivierungs-Mutanten im R6-Hintergrund und in CpH8-Medium keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, waren dramatische Differenzen bei zwei Genen sichtbar, wenn diese in der KP3-Mutante (Cia „ON“) inaktiviert wurden (siehe Abb. 3.14).

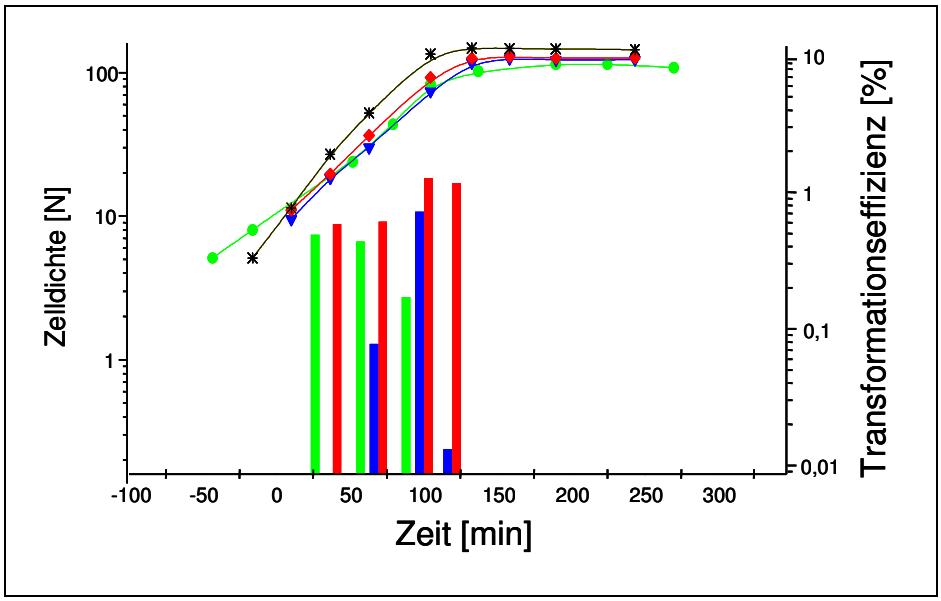



**Abb. 3.14: Kompetenz von Mutanten mit inaktivierten Schlüsselenzymen HtrA und Spr0782 im Cia „ON“-Hintergrund**
Dargestellt sind die Transformationseffizienzen und Wachstumskurven, welche in CpH8-Medium und in der Anwesenheit von BSA gemessen wurden. Die verwendeten Stämme sind in *htrA* und *spr0782* inaktiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen sowie repräsentative Wachstumskurven. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten, auf der linken Ordinate die Zelldichte, auf der rechten Ordinate die Transformationseffizienz in Prozent aufgetragen. Es wurde mit AmiA9-DNA transformiert. R6 ( ◆ ), KP212 (*spr0782*, ● ), KP216 (*htrA*, ▼ ), KP3 (Cia „ON“, ✳ ).

Mit KP212 (*spr0782*) konnten in der frühen Wachstumsphase 0,48% Transformanten erhalten werden. Bei KP216 (*htrA*) wurde eine maximale Effizienz bei N40 mit 0,72% erreicht. Alle anderen Stämme mit $CiaH_{C306}$ T230P-Hintergrund (KP3) können nicht transformiert werden oder sind unterhalb des Detektionsniveaus. Die Proteine Spr0782 und HtrA (Spr2045) sind demnach an der Cia-bedingten Reprimierung der Transformation beteiligt. Im Wildtyp scheint die Inaktivierung von *spr0782* und *htrA* keine Erhöhung der Transformation zu bewirken, da möglicherweise die Transformation im CpH8-Medium schon auf einem hohen Niveau ist und nur noch gering durch den Verlust des gesamten Cia-Systems bzw. der hier vorgestellten Proteine gesteigert werden kann.
Neben der Resistenz und Kompetenz ist ein weiterer Cia „OFF“-Phänotyp die erhöhte Suszeptibilität gegenüber Antibiotika-induzierter Lyse (siehe Kapitel 3.1). Dafür wurden wachsende Zellen mit 0,45 µg/ml Vancomycin ab Nephelo 20 behandelt (Abb. 3.15). In A ist die Lyse der Mutanten im R6-Hintergrund gezeigt, in Abb. 3.15 B die im KP3-Hintergrund (Cia „ON“). Die Ausgangsstämme und als weitere Kontrolle die KP1-Mutante (Cia „OFF“) sind in Abb. 3.15 C dargestellt.

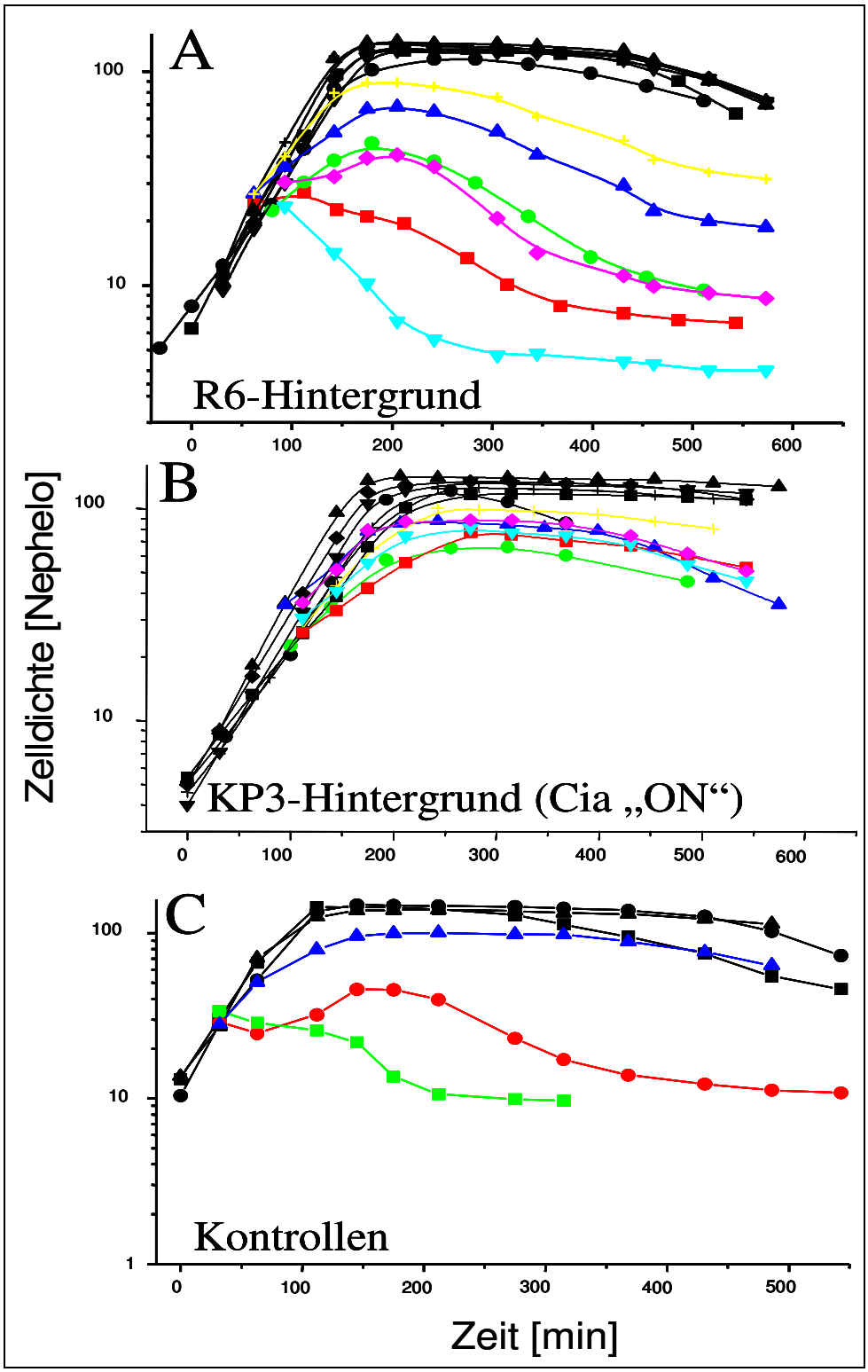



**Abb. 3.15: Einfluss von Vancomycin-Behandlung auf Mutanten in Cia-regulierten Genen**

Dargestellt sind Wachstumskurven in CpH8-Medium. Vancomycin wurde bei Nephelo 20 zugegeben. Die Kulturen ohne Antibiotika sind schwarz, die mit Antibiotika-Behandlung sind farbig markiert. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten, auf der Ordinate die Zelldichte in Nephelo angegeben. A = Stämme mit Inaktivierungen im Wildtyp-Hintergrund, KP201 (*manLMN*, ■ ), KP202 (*spr0782*, ● ), KP203 (*spr0931*, ▲ ), KP204 (*mal*-Gene, ▼ ), KP205 (*dltABCD*, ◆ ), KP206 (*htrA*, + ); B = Stämme mit Inaktivierungen in dem Cia „ON“-Hintergrund (KP3), KP211 (*manLMN*, ■ ), KP212 (*spr0782*, ● ), KP213 (*spr0931*, ▲ ), KP214 (*mal*-Gene, ▼ ), KP215 (*dlt*-Gene, ◆ ), KP216 (*htrA*, + ); C = Kontrollen, R6 ( ● ), KP1 (Cia „OFF“, ■ ), KP3 (Cia „ON“, ▲ ).

In Abb. 3.15 ist erkennbar, dass alle Stämme mit dem $CiaH_{C306}$ T230P-Allel (Abb. 3.15 B) eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin-induzierter Lyse hatten als der Wildtyp R6 (Abb. 3.15 C, roter Kreis). Unter den Stämmen mit diesem Allel befand sich keiner, der durch die Inaktivierung eines Zielgens empfindlicher in der Lyse reagierte. Im Gegensatz dazu führten die Inaktivierungen der *man*-Gene und der *mal*-Gene alleine ohne zusätzliche Cia-Mutationen im Wildtyp R6-Hintergrund zu einer höheren Empfindlichkeit als die anderen Inaktivierungen. Dies könnte möglicherweise mit einem veränderten Zuckerstoffwechsel als Folge der Inaktivierungen der *man*- und der *mal*-Gene zusammenhängen.

Spr0782 ist als hypothetisches Protein annotiert. Eine BLAST-Suche ergab nur bei Streptokokken homologe Genprodukte, die auch alle als hypothetisch annotiert waren. Eine Computer-gestützte Charakterisierung des annotierten Spr0782-Proteins lieferte Hinweise auf eine mögliche Transmembrandomäne (siehe Abb. 3.16).

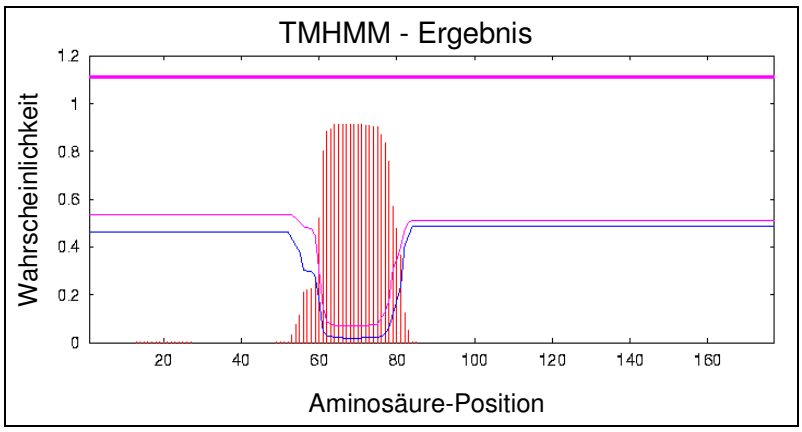



**Abb. 3.16: Vorhersage von Transmembrandomänen im Spr0782-Protein**

Für die Vorhersage wurde der TMHMM Server 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) benutzt. Die Wahrscheinlichkeit für die Position der Aminosäure außerhalb oder innerhalb der Zelle ist auf der Ordinate angegeben, die Anzahl bzw. Position der Aminosäuren auf der Abszisse. Die drei Linien stellen drei verschiedene Berechnungsverfahren Transmembrandomänen dar.

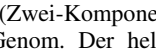
## 3.5 Identifizierung von Vernetzungen des Cia-Systems mit anderen Signaltransduktionswegen

Zur Feinabstimmung von zellulären Antworten können die durch Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) vermittelten Informationsflüsse vernetzt sein. Ein äußeres Signal kann von einer Histidinkinase (HK) an mehrere Responseregulatoren (RR) weitergeleitet werden (Signalamplifikation). Es kann auch ein äußeres Signal von mehreren Histidinkinasen (HK) erkannt werden, die dann einen Responseregulator (RR) phosphorylieren (Signalintegration). Ein hoher Vernetzungsgrad der TCS wird angenommen, da die Inaktivierungen von HK meistens einen geringeren Phänotyp aufweisen als die Inaktivierungen von RR (Throup *et al.*, 2000).
Die Interaktion zwischen dem Cia- und dem ComCDE-System ist schon seit der Entdeckung des Cia-Systems bekannt, da eine Veränderung des Aktivierungzustandes des Cia-Systems die Kompetenz beeinflusst.
Die Inaktivierung von CiaH vermittelt Resistenz, aber keinen Phänotyp bezüglich Autolyse oder Kompetenz. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Untersuchungen in *S. mutans*, wo die Inaktivierung von CiaH zu vielfältigen Effekten führte (Qi *et al.*, 2004). In *S. pneumoniae* werden die durch die CiaH-Inaktivierung ausgelösten Phänotypen nur in Gegenwart von CiaR vermittelt. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Annahme, dass dieser Effekt durch Phosphorylierung von CiaR – und damit Aktivierung – hervorgerufen wird. Für diese Phosphorylierung müsste folglich eine andere HK als CiaH verantwortlich sein. Auf der anderen Seite könnte es aber preferentiell die Phosphatase-Aktivität von CiaH sein, dessen Wegfall der entscheidende Faktor ist. Crosstalk auf dieser Ebene würde bedeuten, dass eine andere HK CiaR phosphoryliert und somit der Phosphorylierungsstatus von CiaR durch den Wegfall von CiaH in Richtung phosphoryliertem Zustand verschoben wird. In diesem Fall sollte erwartet werden, dass Doppelmutanten von CiaH und dieser anderen HK einen Cia „OFF"-ähnlichen Phänotyp haben sollten, d.h. höhere Empfindlichkeit gegenüber Lyse induzierenden Bedingungen. Aus diesem Grund sollten die Phänotypen von Doppelmutanten in CiaH und einer anderen HK in *S. pneumoniae* untersucht werden.

Nach oben aufgestellter Hypothese gibt es 12 Histidinkinasen, die an dem Crosstalk mit CiaR beteiligt sein könnten. Dabei ist es am wahrscheinlichsten, dass eine Histidinkinase der gleichen Unterfamilie von CiaH diese ersetzen kann. So wurden aufgrund von Homologievergleichen HK01, HK02, HK04, CiaH, HK06 und HK08 in die gleiche Unterfamilie gruppiert (Lange *et al.*, 1999). Eine andere Studie schließt die HK10 in diese Gruppe mit ein (Throup *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden Insertionsmutanten in allen 12 einzelnen Histidinkinasen im Wildtyp R6-Stamm konstruiert und mit der Inaktivierung von *ciaH* (KP2-Stamm) kombiniert. Zusätzlich wurden vier Einzelmutanten mit der Inaktivierung jeweils einer Histidinkinase konstruiert. Bei der Konstruktion dieser Stämme konnte auf acht Einzelmutanten (HK01, HK02, HK03, HK04, HK06, HK08, HK09, HK13) zurückgegriffen werden, die durch die Firma SmithKline Beecham Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt wurden (Throup *et al.*, 2000). In diesen Stämmen sind die HK durch eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermAM*) inaktiviert. Um sicherzustellen, dass dergleiche genetische Hintergrund gewährleistet ist, wurde aus diesen Stämmen der entsprechende Bereich herausamplifiziert und in den R6 bzw. in den KP2-Stamm (*ciaH*::*aad9*-Mutation) transferiert. Die restlichen vier Deletionsstämme (HK07, HK10, HK11, HK12) wurden nach dem Prinzip der überlappenden PCR hergestellt (siehe Abb. 2.1). Bei HK11 und HK12 wurde die Januskassette (Sung *et al.*, 2001) eingesetzt, welche zu einer *in frame* Deletion innerhalb der HK-Gene führen kann. Die Januskassette wurde nur für diese beiden Inaktivierungen benutzt, da diese zeitlich nicht früher zur Verfügung stand. Es wurden jedoch die Stämme mit der Insertion der Januskassette und nicht die *in frame* Deletionsstämme verwendet. Bei allen

anderen Stämmen wurde die *ermAM*-Kassette (Martin *et al.*, 1987) eingesetzt. Die 13 Zwei-Komponenten-Systeme aus *S. pneumoniae* und die Inaktivierungen der 12 HK (nicht CiaH) sind in Abb. 3.5 zusammengefasst.

**Tab. 3.5: Die 13 Zwei-Komponenten-Systeme aus *S. pneumoniae* und deren Inaktivierungsderivate**

| TCS | Orientierung | Gennummern | Genname (sofern vorhanden) | Position der *ermAM*-Kassette in HK [bp] |
|---|---|---|---|---|
| TCS01 | | *spr1473/spr1474* | | 17 – 922 |
| TCS02 | | *spr1106/spr1107* | *vicRK* | 91 – 1185 |
| TCS03 | | *spr0343/spr0344* | | 31 - 775 |
| TCS04 | | *spr1893/spr1894* | *pnpRS* | 101 – 1312 |
| TCS05 | | *spr0707/spr0708* | *ciaRH* | |
| TCS06 | | *spr1997/spr1998* | | 3 – 524 |
| TCS07 |  | *spr0153/spr0154* | | 137 – 642 |
| TCS08 | | *spr0076/spr0077* | | 2 – 560 |
| TCS09 |  | *spr0578/spr0579* | *zmpSR* | 1 – 257 |
| TCS10 | | *spr0528/spr0529* | *vncRS* | 69 – 1167 |
| TCS11 | | *spr1814/spr1815* | | 62 – 1064* |
| TCS12 | | *spr2041/spr2042* | *comDE* | 132 – 1257* |
| TCS13 |  | *spr0463/spr0464* | *blpRH* | 1 – 846 |

Abgebildet sind die 13 TCS (Zwei-Komponenten-System) aus *S. pneumoniae*. Die Orientierung zeigt die Operonstruktur der TCS sowie die Lage im Genom. Der hellgraue Pfeil repräsentiert den Responseregulator, der dunkelgraue Pfeil die Histidinkinase. Die Basenpaarangaben beziehen sich auf die jeweilige Position in der Histidinkinase (HK). Die *ermAM*-Kassette ist die Erythromycin-Resistenzkassette (Martin *et al.*, 1987). *Die Gene für die HK 11 und HK12 wurden mit der Januskassette inaktiviert.

Bei einer Operonstruktur, in der die HK upstream des RR angeordnet ist (wie es bei TCS03, TCS07, TCS11 und TCS12 der Fall ist), lassen sich zusätzlich polare Effekte auf den RR nicht ausschließen. Die *ermAM*-Kassette besitzt einen konstitutiven Promoter (Martin *et al.*, 1987; Lunsford und London, 1996). Es konnte aber kein Terminatorsignal am Ende der Kassette detektiert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass die Expression der downstream liegenden RR beeinflusst werden könnte. Zusätzlich könnten die TCS03, TCS07 und eventuell auch TCS02 mit weiteren Genen ein Operon bilden, da hier Gene mit weniger als 10 bp Abstand zum TCS downstream annotiert sind. Auch für diese Gene sind polare Effekte durch die Inaktivierung der HK nicht ausgeschlossen. Bei den TCS11 und TCS12 ist die HK ebenfalls upstream des RR angeordnet, allerdings wurde hier die Januskassette verwendet. Bei Bedarf könnten *in frame* Deletionen erzeugt werden, die keine polaren Effekte auf downstream liegende Gene verursachen sollten. Die Januskassette wurde nur für die TCS11 und TCS12 angewandt, da diese bei der Inaktivierung von TCS03 und TCS07 noch nicht zur Verfügung stand.

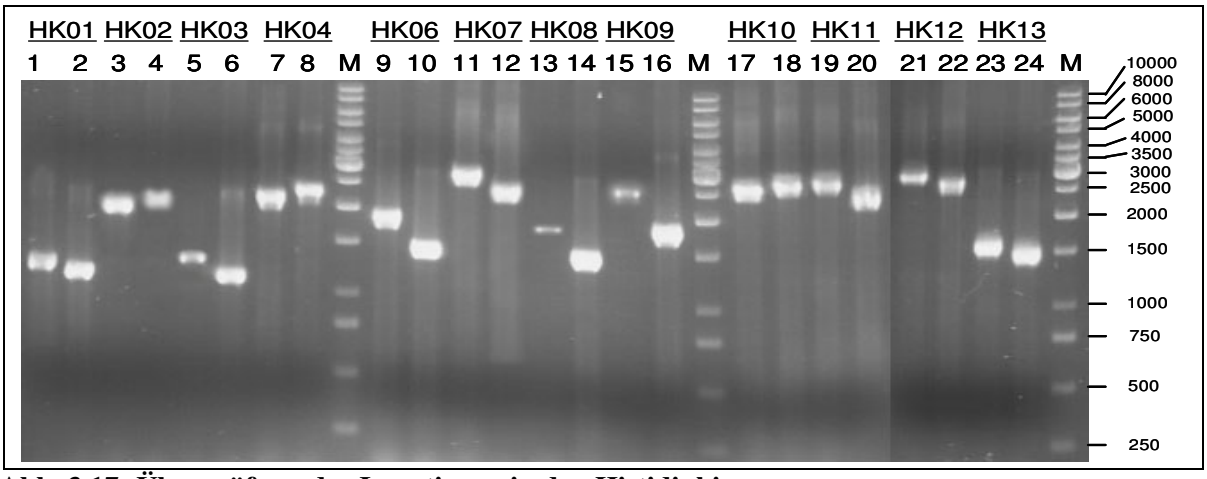



**Abb. 3.17: Überprüfung der Insertionen in den Histidinkinasegenen**

Dargestellt ist die PCR-Überprüfung der *ermAM*-Insertionen in den Histidinkinasegenen. Die PCR wurde mit Primern (siehe Tab. 2.8) durchgeführt, die außerhalb des jeweiligen Gens für die HK liegen. Gerade Zahlen stellen die Kontrolle mit chromosomaler DNA von R6 dar, ungerade Zahlen die Stämme mit den jeweils inaktivierten HK. 1,2 = HK01, 3,4 = HK02, 5,6 = HK03, 7,8 = HK04, 9,10 = HK06, 11,12 = HK07, 13,14 = HK08, 15,16 = HK09, 17,18 = HK10, 19,20 = HK11, 21,22 = HK12, 23,24 = HK13. M = Größenstandard. Die Fragmentgrößen des Standards sind im rechten Teil der Abb. indiziert. Die genaue Größe der Fragmente ist in Tab. 3.6 gezeigt.

**Tab. 3.6: DNA-Fragmente, die zur Überprüfung der inserierten *ermAM*-Kassette in den verschiedenen Histidinkinasegenen erhalten wurden**

| Primerkombination | Inaktivierte HK | Erwartete Fragmentgröße mit Insertion [bp] | Erwartete Fragmentgröße ohne Insertion [bp] | Größe des erhaltenen Fragments (siehe Spur in Abb.3.17) |
|---|---|---|---|---|
| HK01_for – HK01_rev | HK01 | 1189 | 1155 | 1, 2 |
| HK02P1 – HK02P4 | HK02 | 2020 | 2175 | 3, 4 |
| HK03_for – HK03_rev | HK03 | 1324 | 1129 | 5, 6 |
| HK04P1 – HK04P4 | HK04 | 2088 | 2362 | 7, 8 |
| HK06P1 – HK06P4 | HK06 | 1900 | 1484 | 9, 10 |
| HK07_A_for – HK07_B_rev | HK07 | 2943 | 2470 | 11, 12 |
| HK08P1 – HK08P4 | HK08 | 1842 | 1463 | 13, 14 |
| HK09_for – HK09_rev | HK09 | 2534 | 1852 | 15, 16 |
| HK10_A_for – HK10_B_rev | HK10 | 2728 | 2889 | 17, 18 |
| HK11_A_for – HK11_B_rev | HK11 | 2901 | 2502 | 19, 20 |
| HK12_A_for – HK12_B_rev | HK12 | 3180 | 2904 | 21, 22 |
| HK13_for – HK13_rev | HK13 | 1592 | 1499 | 23, 24 |

Die Primersequenzen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die Nummern in Spalte fünf beziehen sich auf die Spuren in Abb. 3.17.

Die Überprüfung der Inaktivierungen wurde mittels PCR und anschließender Sequenzierung durchgeführt (Tabelle 3.6).

Überraschenderweise wurde bei der Sequenzierung der Insertionen festgestellt, dass die von der Firma SmithKline Beecham Pharmaceuticals hergestellten Konstruktionen *HK06::ermAM, HK08::ermAM* und *HK09::ermAM* einen verlängerten RR aufwiesen. In Abb. 3.18 ist der Übergang des RR06 und RR08 zu der *ermAM*-Kassette bzw. der HK dargestellt. Durch das inserierte DNA-Fragment wurde auch das Stopcodon des downstream der HK gelegenen RR betroffen, so dass bei RR06 ein um neun Aminosäuren, bei RR08 ein um 15 Aminosäuren und bei RR09 ein um 34 Aminosäuren verlängertes Protein gebildet werden sollte. Es wurde zu diesem Zeitpunkt darauf verzichtet neue Mutanten herzustellen, da nicht davon auszugehen ist, dass die Funktion der RR beeinträchtigt ist. Hierfür spricht, dass erstens die DNA-Bindedomäne der RR sieben bzw. drei Aminosäuren vor dem eigentlichen Ende der Proteine aufhört und zweitens auch C-terminale Fusionen wie z. B. ein Histag die Funktionsfähigkeit von Proteinen in der Regel nicht beeinflusst.

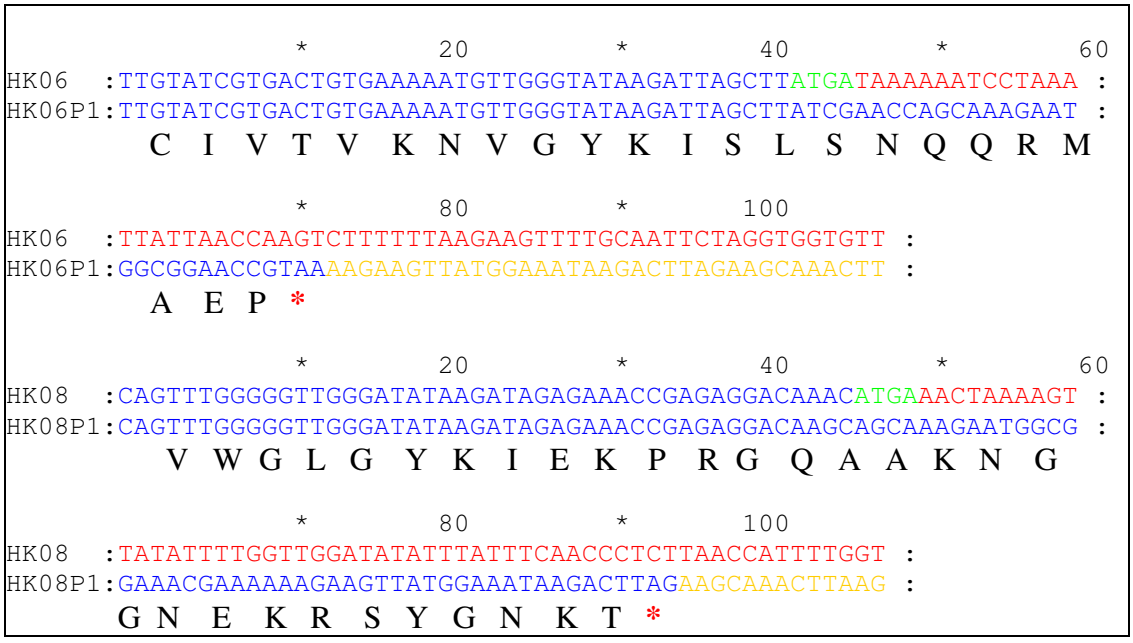



**Abb. 3.18: Sequenzvergleiche der *ermAM*-Insertionen in HK06 und HK08**

Gezeigt sind die Sequenzen des 3'-Endes der RR06 bzw. RR08 und des 5'-Anfangs der HK06 bzw. HK08. Die obere Sequenz stellt jeweils die Wildtyp-Situation dar. Die blau markierte Sequenz zeigt den RR, grün ist die überlappende Sequenz zwischen dem RR und der HK, rot ist die HK Sequenz. Die unterschiedliche Sequenz aus der Resistenzkassette ist gelb markiert. Da das TGA-Stopcodon der RR durch die Inaktivierung verändert wurde, ist der RR um 9 bzw. 15 Aminosäuren verlängert. Der rote Stern markiert das neue Stopcodon des verlängerten RR. Die großen Buchstaben unterhalb der Sequenz zeigen die Aminosäuresequenzen. Die Zahlen über der Sequenz zeigen die Anzahl der Basen an.

Zur Beschreibung der Stämme wurden deren Generationszeiten und deren minimale Hemmkonzentrationen (MHK) für Cefotaxim bestimmt. Diese sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

**Tab. 3.7: Generationszeiten und MHK für Cefotaxim von Stämmen mit zwei fehlenden Histidinkinasen**

| Stamm | von R6 abweichende Merkmale | Generationszeit [min] | MHK Cefotaxim [µg/ml] |
|---|---|---|---|
| R6 | | 32 | 0,02 |
| KP2 | *ciaH::aad9* | 32 | 0,04 |
| KP3 | $ciaH_{C306}$ C688A (Cia „ON“) | 32 | 0,04 |
| KP305 | *ciaH::aad9*, *spr1473*::*ermAM* (HK1) | 29 | 0,025 |
| KP306 | *ciaH::aad9*, *spr1106*::*ermAM* (HK2) | 29 | 0,0225 |
| KP307 | *ciaH::aad9*, *spr0343*::*ermAM* (HK3) | 42 | 0,02 |
| KP308 | *ciaH::aad9*, *spr1894*::*ermAM* (HK4) | 28 | 0,025 |
| KP309 | *ciaH::aad9*, *spr1997*::*ermAM* (HK6) | 28 | 0,025 |
| KP310 | *ciaH::aad9*, *spr0153*::*ermAM* (HK7) | 29 | 0,03 |
| KP311 | *ciaH::aad9*, *spr0077*::*ermAM* (HK8) | 29 | 0,0275 |
| KP312 | *ciaH::aad9*, *spr0579*::*ermAM* (HK9) | 32 | 0,0225 |
| KP313 | *ciaH::aad9*, *spr0529*::*ermAM* (HK10) | 32 | 0,025 |
| KP314 | *ciaH::aad9*, *spr1815*::kan-rpsL$^+$ (HK11) | 29 | 0,03 |
| KP315 | *ciaH::aad9*, *spr2042*::kan-rpsL$^+$ (HK12) | 32 | 0,03 |
| KP316 | *ciaH::aad9*, *spr0464*::*ermAM* (HK13) | 31 | 0,02 |

Dargestellt sind die Stämme, in denen neben CiaH eine weitere HK mit einem Marker-Insert unterbrochen wurde sowie R6, KP2 und KP3 (Cia „ON“) als Ausgangs- und Kontrollstämme. Für die MHK sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen angegeben. Für die Generationszeiten ist eine repräsentative Messung von zwei unabhängigen Messungen dargestellt. *Kan-rpsL*$^+$ stellt die Januskassette dar (Sung *et al.*, 2001).

Die in Tab. 3.7 dargestellten MHK-Werte für Cefotaxim liegen alle zwischen 0,02 und 0,03 µg/ml und sind damit nicht signifikant verschieden von dem Ausgangsstamm R6; ein Wert von 0,04 µg/ml der Einzelmutante in CiaH wurde in keinem anderen Fall erreicht. Die Generationszeiten lagen fast immer zwischen 29 und 32 Minuten. Nur die Kombination der Inaktivierungen von HK03 und CiaH führte zu einer höheren Generationszeit von 42 Minuten.

Ein weiterer Cia-Effekt stellt die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Lyse dar (siehe Kapitel 3.1) und wurde in Flüssigkultur nach Zugabe von 0,45 µg/ml Vancomycin in den Doppelmutanten untersucht. Es wurden zuerst die Stämme mit zwei fehlenden HK auf Cia „OFF"-phänotypisches Lyseverhalten untersucht (Abb. 3.19 B nd C). Zu denjenigen, die sich ähnlich zu KP1 (Cia „OFF") verhalten (Abb. 3.19 A), wurden die entsprechenden Einzelmutanten näher betrachtet (Abb. 3.19 D), um die Stämme ausschließen zu können, die durch den alleinigen Verlust einer HK den Cia „OFF"-Phänotyp zeigten.

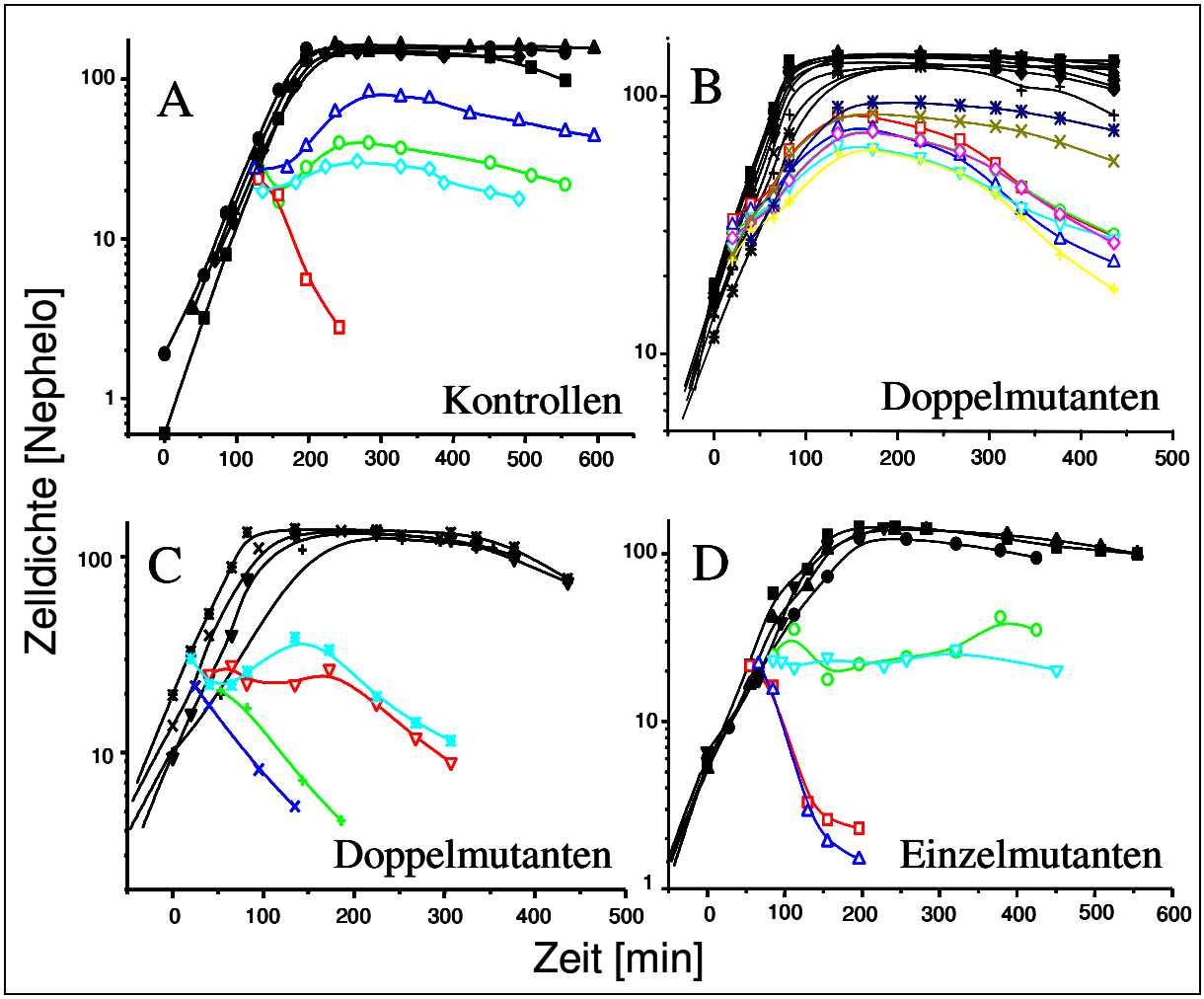



**Abb. 3.19: Einfluss von Vancomycin-induzierter Lyse auf die Mutanten in CiaH in Kombination mit einer weiteren HK**

In logarithmisch wachsenden Kulturen wurde bei Nephelo 20 0,45 µg/ml Vancomycin zugegeben und das weitere Wachstum kontrolliert. Die Kurven ohne Antibiotikum sind schwarz, die Kurven mit Antibiotikum sind farbig gezeichnet. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Zelldichte in Nephelo. A = R6 ( ○ ), KP1 (Cia „OFF", □ ), KP2 (*ciaH*::*aad9*, ◇ ), KP3 (Cia „ON", △ ); B = KP306 (HK02, □ ), KP308 (HK04, ○ ), KP309 ( HK06, △ ), KP310 (HK07, ▽ ), KP311 (HK08, ◇ ), KP313 (HK10, + ), KP314 (HK11, × ), KP315 (HK12, ✳ ); C = KP305 (HK01, ▽ ), KP307 (HK03, + ), KP312 (HK09, × ), KP316 (HK13, ✳ ); D = KP301 (CiaH$^+$, HK01, □ ), KP302 (CiaH$^+$, HK03, ○ ), KP303 (CiaH$^+$, HK09, △ ), KP304 (CiaH$^+$, HK13, ▽ ). CiaH$^+$ = funktionelles CiaH (Wildtyp-Form) vorhanden.

Alle Stämme aus Abb. 3.19 B wiesen keinen Unterschied in ihrem Zelllyse-Verhalten zum Wildtyp R6 auf. Im Gegensatz dazu sind in Abb. 3.19 C die Stämme abgebildet, denen zwei HK fehlen und sich ähnlich zu dem Cia „OFF"-Phänotyp verhielten (Abb. 3.19 A). Die Stämme, denen HK01 und HK09 fehlen, zeigten alleine durch den Verlust dieser Proteine ein verstärktes Lyseverhalten (Abb. 3.19 D). Die Inaktivierung von HK03 oder HK13 verursachten nur in Kombination mit der CiaH-Inaktivierung eine erhöhte Lyse (Abb. 3.19 C). Damit konnten HK03 und HK13 identifiziert werden, deren Inaktivierungen in Kombination mit dem Fehlen von CiaH eine dramatischere Lyseempfindlichkeit im Vergleich zu den Einzelinaktivierungen von HK03 und HK13 verursachte.
Die hier vorgestellten Experimente verdeutlichen, dass eine Vernetzung von Signaltransduktionswegen, die das Cia-TCS einschließt, in *S. pneumoniae* R6 vorhanden sein könnte. Besonders die TCS03 und TCS13 könnten mit den Cia-TCS involviert sein. Inaktivierungen in CiaH und HK03 bzw. HK13 zeigten eine ausgeprägte Lyseempfindlichkeit. Die Inaktivierung von CiaH und HK03 führte zu einem langsameren Wachstum.

## B. Globale Transkriptionsanalysen

Die DNA-Chip-Technik gehört zu den relativ jungen High-Throughput-Techniken der Molekularbiologie. Sie ist ein methodischer Ansatz zur genomweiten, funktionellen *in vivo*-Analyse. Traditionelle Hybridisierungsassays, entwickelt in den 1970ern, haben flexible Membranen verwendet, wie z.B. Nitrocellulose oder Nylon, und mit Radioaktivität und autoradiographischen Verfahren gearbeitet. Im Gegensatz dazu werden in den Mikroarray- oder Biochipassays feste Oberflächen wie z.B. Glas mit Fluoreszenzmarkierung und -detektion benutzt. Im Vergleich zum makroskopischen Format von Filter-basierten Assays repräsentiert das miniaturisierte Biochipformat eine fundamentale Revolution in der biologischen Analyse. Ein Vorteil des Chipformats ist die feste Oberfläche als nicht-poröses Material, welches die Deposition von kleinen Volumina biochemischen Materials an einer exakt definierten Position ermöglicht. Poröse Substrate wie z.B. Nylon und Nitrocellulose erlauben die Diffusion von verwendetem Material und sind für Mikroarraypräparationen nicht applizierbar. Auch verhindert ein nicht-poröses Substrat die Absorption von Reagentien und Probe in die Substratmatrix und erlaubt im Gegenzug das schnelle Abnehmen von organischen und fluoreszierenden Komponenten während der Biochipfabrikation und des –gebrauchs. Ebenso gestattet eine nicht-poröse Oberfläche den Gebrauch von kleinen Probenvolumina und damit eine hohe Probenkonzentration und schnelle Hybridisierungskinetiken. Ein weiterer Vorteil des Mikroarrayformats ist die inhärente Flachheit, welche echte Parallelität erlaubt, die in allen Filter-basierten Assays fehlt. Durch die Möglichkeit der parallelen Analyse kann eine signifikante Erhöhung an akkuraten Assaydaten erreicht werden.
Mit Hilfe der Mikroarray-Technik lassen sich komplexe Fragestellungen im biomedizinischen Bereich beantworten. Mit dem Prinzip dieser Technik können viele verschiedene sogenannte „Features“ gleichzeitig untersucht werden. Features können DNA-Fragmente, Proteine oder chemische Substanzen sein, die auf einem Slide immobilisiert werden. Es gibt zwei Typen von DNA-Chips: Oligoarrays und cDNA- oder PCR-Arrays. Die immer noch wichtigste Anwendung der DNA-Arrays stellt die globale Transkriptionsanalyse dar, bei der die Expression von sehr vielen Genen gleichzeitig analysiert werden kann (82%, Schena, 2003). Das Prinzip dieser Analytik ist – abhängig von Organismus und exakter Fragestellung – immer identisch: ein Kontrollstamm und eine zu untersuchende Testkultur werden unter gleichen Bedingungen kultiviert, geerntet und die Gesamt- bzw. Teil-RNA isoliert. Diese wird meistens in einer cDNA-Synthesereaktion durch den Einbau von fluoreszierenden Molekülen markiert (in dieser Arbeit Cy3 und Cy5) und auf einem DNA-Mikroarray kompetitiv hybridisiert und analysiert. Durch den Einbau von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen für die Referenz- und die Testkultur kann nach der Hybridisierung eine Aussage über die relative Quantität von einzelnen RNA-Fragmenten in den Zellen anhand der Signalstärke auf dem Slide gemacht werden. So lassen sich komplexe Regulons und regulatorische Netzwerke identifizieren.
Neben den vielen Vorteilen hat die Mikroarray-Technik aber auch Grenzen. Es gibt viele regulatorische Prozesse, die mit dieser Technik nicht identifiziert werden können. Eine Arrayanalyse kann nur so gut sein, wie seine Features auf dem Slide sind. Wenn die Gene nicht richtig annotiert worden sind oder das Oligo- bzw. PCR-Design fehlerhaft war, sind Rückschlüsse Ergebnisse möglicherweise irreführend. Es können auch zelluläre Prozesse zu physiologischen Änderungen führen, wie z.B. Regulation durch sRNAs oder durch posttranskribtionale Prozesse, die nicht mit dieser Technik identifiziert werden können.
Die Technik wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Genexpression der *S. pneumoniae* R6-Gene in Zusammenhang mit dem Aktivierungszustand des Cia-Regulationssystems unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Um diese Experimente durchführen zu können, musste die Oligo-basierte Mikroarray-Technik etabliert werden. Dieser Teil der Arbeit

beschäftigte sich daher eingehend mit der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte, die letztendlich zu einem Standard-Protokoll führten. Dieses bildete die Grundlage für die Experimente, auf die in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen wird.
Der Prozess der Mikroarray-Technik gliedert sich in fünf Schritte: Herstellung der Biochips, Anfertigung der Hybridisierungssonde, Hybridisierung, Datenaquisition und Datenanalyse. Unter Umständen stellt die Produktion der Features einen weiteren Schritt in diesem Prozess dar. In dieser Arbeit wurde das *S. pneumoniae* R6 Oligo-Set von MWG-Biotech AG verwendet. In den nachfolgenden Anschnitten wird die Qualitätsüberprüfung der einzelnen Schritte im Mikroarray-Prozess und des Oligo-Sets näher vorgestellt.

## 3.6 Etablierung der Mikroarray-Technik

### 3.6.1 Validierung des *Streptococcus pneumoniae* R6 Oligo-Sets

**Computer-gestützte Charakterisierung**
Als Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Mikroarray-Versuche diente das *S. pneumoniae* R6 Oligo-Set von MWG Biotech AG (Ebersberg), welches aus 2018 *S. pneumoniae*-spezifischen und 3 *Arabidopsis thaliana*-spezifischen als Negativ-kontrollen dienenden Oligos besteht und seit Ende 2002 erhältlich war. Jedes Oligo ist 50 Basen lang und enthält am 5'-Ende einen Amino-C6-Linker. Da für dieses Oligo-Set zu Beginn dieser Arbeit keine Validierung zur Verfügung stand und noch keine mit diesem Set generierten Daten publiziert wurden, musste das Set anhand von *in silico*-Parametern charakterisiert und experimentell überprüft werden. Mittlerweile gibt es eine publizierte Arbeit (Ko *et al.*, 2006), die dieses Oligo-Set verwendet hat. Diese geht aber nicht auf die Validierung des Oligo-Sets ein. Deshalb sollte hier für die Validierung ein genomischer DNA-Vergleich zwischen *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 angewandt werden, da die Genomsequenz von beiden Organismen bekannt ist und so exakte Vorhersagen überprüfbar sind. Die Oligo-Set beschreibenden Parameter sind: Schmelztemperatur-Verteilung, GC-Gehaltverteilung und Position der Oligos vom 3'-Ende. Zusätzlich wurde noch die Kreuz-Hybridisierungs-Identität berechnet, welche als maximale Alignment-Länge zu einem Nicht-Selbst-Gen definiert ist. In den Abb. 3.20 – 3.23 sind diese Parameter der R6-Oligos aufgetragen.

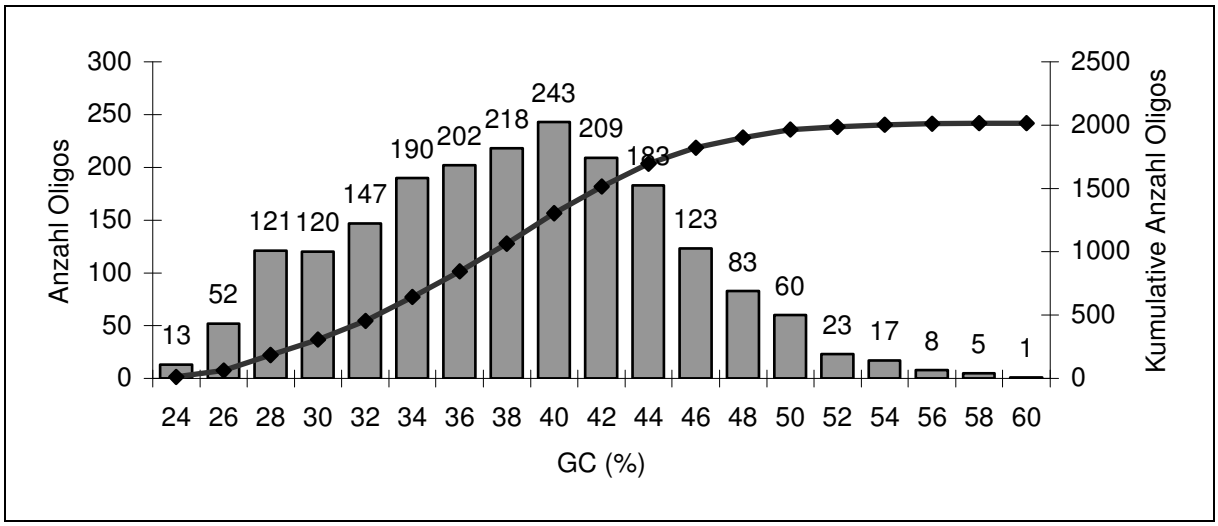



**Abb. 3.20: Verteilung des GC-Gehalts der Oligos im R6-Oligo-Set**
Dargestellt ist die Verteilung des GC-Gehalts von 2018 *S. pneumoniae*-spezifischen 50mer-Oligos. Die kumulative Anzahl der Oligos ist als schwarze Linie wiedergegeben. Die Zahl über den Balken zeigt deren Quantität. Der GC-Gehalt wurde mit Microsoft Excel berechnet. Auf der Abszisse ist der GC-Gehalt, auf der linken Ordinate die absolute Anzahl der Oligos, auf der rechten Ordinate die kumulative Anzahl der Oligos aufgetragen.

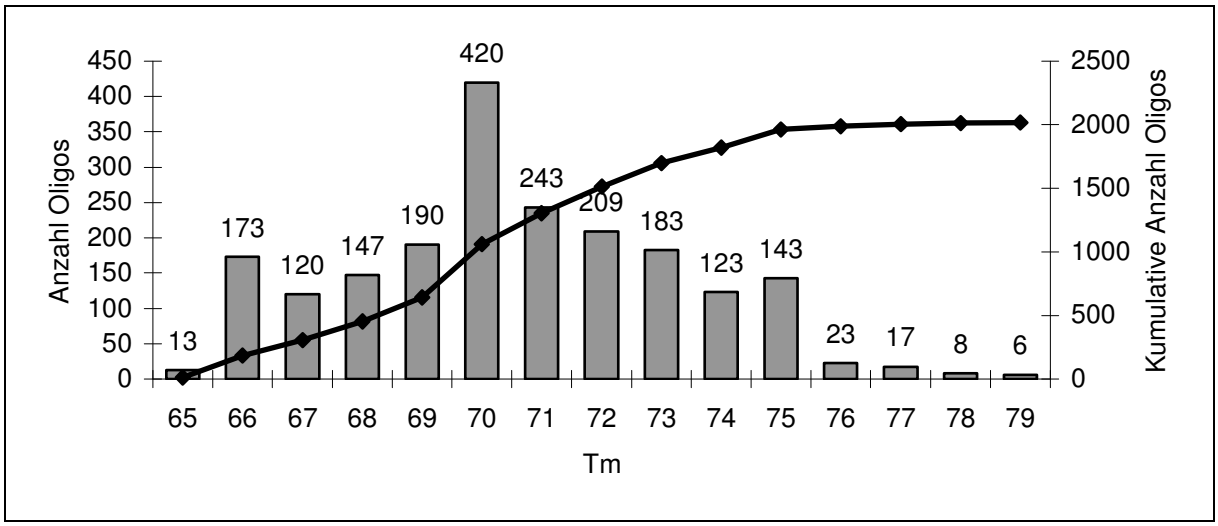



**Abb. 3.21: Verteilung der Schmelztemperatur der Oligos im R6-Oligo-Set**
Abgebildet ist die Verteilung der Schmelztemperatur von 2018 *S. pneumoniae*-spezifischen 50mer Oligos. Die Berechnung der Schmelztemperatur (Tm) in °C wurde nach der Formel aus Kapitel 2.8 durchgeführt. Die kumulative Anzahl der Oligos ist als schwarze Linie wiedergegeben. Die Zahl über den Balken zeigt deren Quantität. Auf der Abszisse ist die Schmelztemperatur (Tm), auf der linken Ordinate die absolute Anzahl der Oligos, auf der rechten Ordinate die kumulative Anzahl der Oligos aufgetragen.

Wie aus Abb. 3.20 ersichtlich, ist der GC-Gehalt der Oligos um 38 oder 40% verteilt, welches in etwa auch dem GC-Gehalt der *S. pneumoniae* R6-Gene mit 40,53% (Gesamt-Genom: 39,71%) entspricht. Jedoch ist eine breite Streuung des GC-Gehalts der Oligos vorhanden. Da die Schmelztemperatur eines Oligos von seinem GC-Gehalt abhängig ist und alle Oligos die gleiche Länge haben (50mer), ist in Abb. 3.21 ebenfalls eine breite Verteilung der Schmelztemperatur um 70 oder 71°C ausprägt. Insgesamt sind 67 Oligos (3,3%) außerhalb eines Temperaturbereiches von 70,5 ± 5°C. Verglichen mit dem Array-Ready Oligo-Set für *Escherichia coli* von der Firma OPERON (Huntsville, USA), bei dem alle Oligos im Bereich 75 ± 5°C schmelzen, ist die Verteilung der Schmelztemperatur weniger eingegrenzt.
In den Abb. 3.22 und 3.23 sind die Position der Oligos vom 3'-Ende und die Kreuz-Hybridisierungs-Identität aufgetragen.

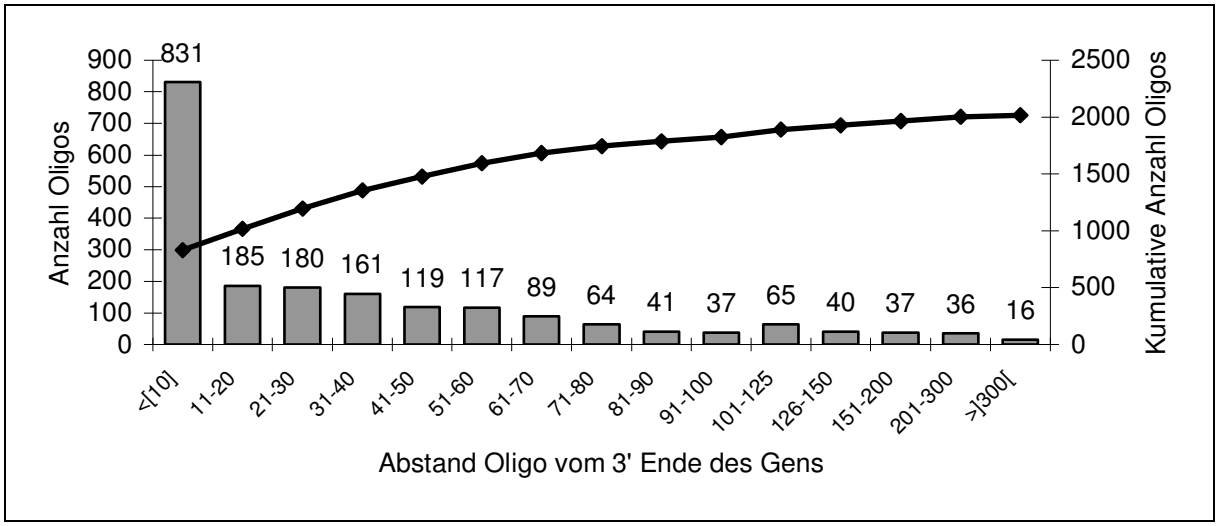



**Abb. 3.22: Verteilung des Abstandes der Oligos vom 3'-Ende des dazugehörigen Gens**
Berechnet wurde die Differenz zwischen dem 3'-Ende des Oligos und dem 3'-Ende des kognaten Gens. Die kumulative Anzahl der Oligos ist als schwarze Linie wiedergegeben. Die Zahl über den Balken zeigt deren Quantität. Auf der Abszisse ist der Abstand vom 3'-Ende, auf der linken Ordinate die absolute Anzahl der Oligos, auf der rechten Ordinate die kumulative Anzahl der Oligos aufgetragen.

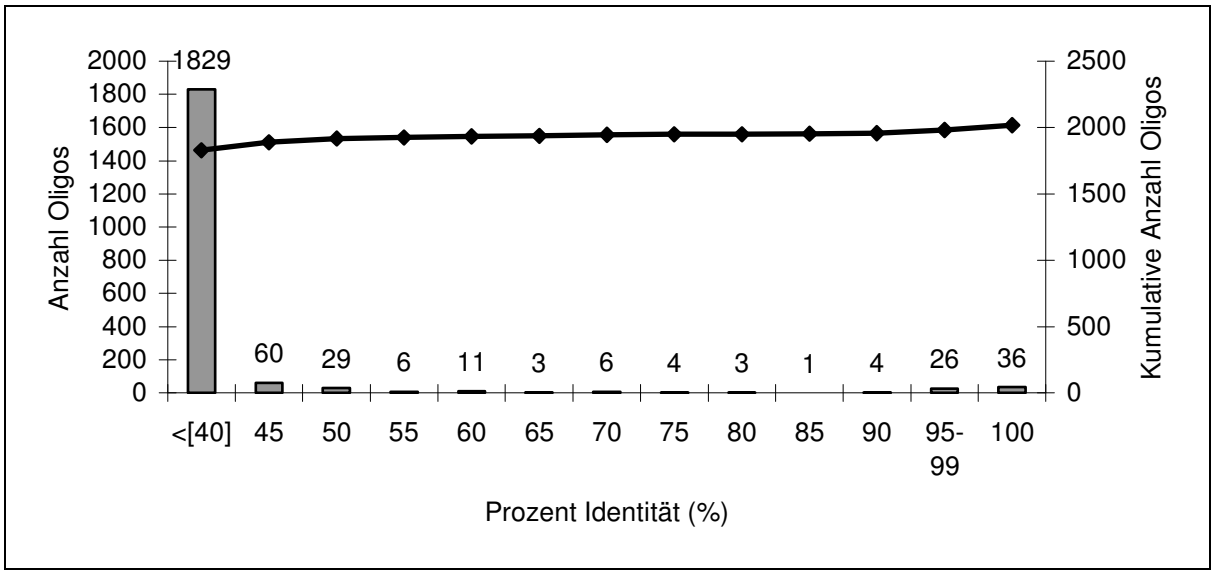



**Abb. 3.23: Verteilung der Kreuz-Hybridisierungs-Identität der *S. pneumoniae* R6 Oligos zu einem Nicht-Selbst-Gen**

Die Kreuz-Hybridisierungs-Identität ist als maximale Alignment-Länge zu einem Nicht-Selbst-Gen definiert. Alle Alignments wurden mit der BLAST-Software durchgeführt. Die kumulative Anzahl der Oligos ist als schwarze Linie wiedergegeben. Die Zahl über den Balken zeigt deren Quantität. Auf der Abszisse ist die Hybridisierungs-Identität, auf der linken Ordinate die absolute Anzahl der Oligos, auf der rechten Ordinate die kumulative Anzahl der Oligos aufgetragen.

Die Position der Oligos innerhalb der dazugehörigen Gene ist maßgeblich vom 3'-Ende der Gene bestimmt. Wie in Abb. 3.22 ersichtlich, liegen 1357 Oligos (67%) näher als einschließlich 40 Basenpaare am 3'-Ende der jeweiligen Gene. Dies ist eine Strategie für eukaryotische Genome, bei denen oft - vorgegeben durch den Poly-A-Schwanz - die cDNA-Synthese vom 3'-Ende gestartet werden kann. Bei Prokaryoten gibt es keinen Poly-A-Schwanz. Eine negative Auswirkung sollte diese Strategie nur dann haben, wenn kein random Hexamer zwischen 3'-Ende der mRNA und der Position des Oligos binden kann, um die cDNA-Synthese vor dem 5'-Ende des Oligos zu initiieren. Da aber die mRNA nicht am Ende eines Gens aufhört und Terminatoren oft stromabwärts von Genen liegen, sollte die Positionierung der Oligos kein Markierungsproblem darstellen. Anhand der Signalstärke nach den Hybridisierungen konnte diese Vermutung bestätigt werden.

Die Verteilung der maximalen Alignment-Länge der Oligos zu einem Nicht-Selbst-Gen (Kreuz-Hybridisierungs-Identität) ist in Abb. 3.23 dargestellt. 86 (4,2%) Oligos haben mehr als 29 Basen Alignment zu einem Nicht-Selbst-Gen. Der Schwellenwert von 29 Basen Alignment wurde experimentell ermittelt (siehe genomischer DNA-Vergleich). Von diesen 86 Oligos stehen 68 (3,4%) Oligos für Transposasen, die unter sich sehr ähnlich sind und deshalb kein Oligodesign ohne Kreuzhybridisierung erlauben. 13 der 86 Oligos (0,64%) identifizieren Gene, die in identischer bzw. fast identischer Kopie mehrmals im Genom vorhanden sind (*spr0013*, *spr0097*, *spr0110*, *spr0325*, *spr0563*, *spr0625*, *spr0645*, *spr1015*, *spr1060*, *spr1081*, *spr1186*, *spr1187*, *spr1282*). Bei 5 Oligos (0,24%) ist kein offensichtlicher Grund für die Kreuz-Hybridisierung zu erkennen (*spr0306*, *spr0816*, *spr1027*, *spr1203*, *spr1552*). Die Gene, deren Oligos eine Kreuz-Hybridisierungs-Identität von mehr als 29 Basen haben, wurden aus den Ergebnisanalysen der Mikroarray-Experimenten ausgeschlossen und sind somit in keiner Ergebnisdarstellung zu finden (Ausnahme: *spr0013, spr1819 = comX*). Manche der Oligos mit Kreuz-Hybridisierung sind als spezifisch für mehrere Gene vom Hersteller gekennzeichnet.

**Genomischer DNA-Vergleich von *S. pneumoniae* R6 und TIGR4**

Um die Spezifität der Oligos im Experiment zu überprüfen, wurde ein Vergleich der genomischen DNA zwischen *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 durchgeführt. Beide Genome sind publiziert (Hoskins *et al.*, 2001; Tettelin *et al.*, 2001) und zum großen Teil identisch. Sie enthalten jedoch 73 (R6) bzw. 194 (TIGR4) Gene, die nur in einem Organismus vorkommen. Daneben gibt es viele variable Gene, die nur bruchstückhaft oder mit veränderten Sequenzen in diesen Organismen konserviert sind (Brückner *et al.*, 2004). Da das Oligo-Set nur R6-spezifische 50mer-Oligos enthält, wurde erwartet, dass die Mehrzahl der Oligos Ratios zu Gunsten von R6 aufweist. Oligos, die auch im TIGR4-Genom vorhanden sind, sollten Ratios um 1 zeigen. Durch dieses Experiment lässt sich auch die Hybridisierungsstringenz überprüfen, da nur bis zu einer spezifischen Identität der Oligos im TIGR4-Genom Ratios zu Gunsten von R6 bzw. um 1 erwartet wurden.

Insgesamt wurden sechs hybridisierte Chips ausgewertet. Es wurden drei Hybridisierungen auf selbstgespotteten Chips und drei Hybridisierungen auf gekauften Chips, die vom Hersteller (MWG Biotech AG, Ebersberg) zur Verfügung gestellt wurden, in die Analyse aufgenommen. Alle Chips enthielten die gleichen Oligos, wobei jedes Oligo auf den gekauften Chips einmal und auf den selbstgespotteten zweimal vorhanden war. Insgesamt konnten so 9 Werte für jedes Oligo generiert werden (6 Werte von den selbstgespotteten und 3 von den gekauften Chips). Dabei wurden die 2 Werte von einem selbstgespotteten Chip zu einem Mittelwert zusammengefasst, so dass letztendlich 6 Werte miteinander verglichen wurden. Von den sechs Hybridisierungen wurden drei mit R6 Cy3 und TIGR4 Cy5 Markierung und drei mit umgekehrter Markierung (R6 Cy5 und TIGR4 Cy3) durchgeführt.

Die Oligos für die Gene *spr0316*, *spr1011* und *spr1022* hatten in allen Hybridisierungen mit genomischer DNA Signalintensitäten von unter 500. Sie wurden erneuert und zeigten danach Intensitäten, die 10 – 20-fach über den vorherigen Werten lagen. Da nur 3 Oligos mit niedrigen Intensitäten gefunden wurden, scheint der Schmelztemperaturbereich während einer Hybridisierung breit genug zu sein, um die 67 Oligos, die außerhalb von 70,5 ± 5°C schmelzen, noch zu erfassen (siehe Abb. 3.21).

Ein Vergleich zwischen den experimentellen Hybridisierungsergebnissen und dem maximalen Alignment der R6-spezifischen Oligos im *S. pneumoniae* TIGR4-Genom ist teilweise in der Tabelle 3.8 dargestellt. Die Tabelle zeigt die Oligos, die 18 bis 36 Basen Identität im TIGR4-Genom haben.

Oligos, die weniger als 29 Basen Homologie im TIGR4-Genom haben, zeigten Ratios zu Gunsten von R6 (siehe Tabelle 3.8). Oligos mit mehr als 29 Basen Homologie hatten ein Ratio um 1, d.h. die TIGR4-DNA konnte an diese Oligos ebenso gut binden wie die R6-DNA. Es finden sich jedoch einige Ausnahmen zu dieser Regel. Die Oligos der Gene *spr1574*, *spr0235* und *spr1203* haben Alignment-Längen von 14, 19 und 28 Basenpaaren im TIGR4-Genom. Trotzdem war deren Ratio nur um 1. Umgekehrt wurden 32 Oligos erkannt, die mindestens 36 Basen Identität im TIGR4-Genom haben, und trotzdem ein Ratio zu Gunsten von R6 (> 2) aufwiesen. Da keine Korrelation zur Signalstärke gefunden werden konnte, wurde angenommen, dass diese Fehler durch systematische Markierungsunterschiede oder durch reale Hybridisierungsunterschiede entstanden sind. Dieses Experiment zeigt, dass sich 35 (1,7%) Oligos nicht den Erwartungen entsprechend verhielten. Mögliche Ursachen dafür könnten die Positionen der Fehlpaarungen in der Hybridisierung der 50mer-Oligos sein.

**Tab. 3.8: Verteilung der Ratios (R6-TIGR4) einzelner Gene in Abhängigkeit der Hybridisierungs-Identität**

| Oligo | Hybridisierungs-Identität der R6-Oligos im TIGR4-Genom | Ratio (R6/TIGR4) |
|---|---|---|
| spr1129 | 18 | 2,18 |
| spr0235 | 19 | 1,12 |
| spr0310 | 19 | 4,74 |
| spr1023 | 19 | 2 |
| spr1404 | 19 | 4,82 |
| spr0465 | 20 | 3,37 |
| spr0491 | 20 | 4,19 |
| spr0730 | 20 | 3,47 |
| spr0791 | 20 | 7,13 |
| spr0910 | 20 | 2,9 |
| spr1483 | 20 | 5,61 |
| spr0319 | 21 | 18,52 |
| spr0103 | 24 | 3,57 |
| spr1203 | 28 | 0,72 |
| spr0098 | 29 | 1,72 |
| spr0104 | 29 | 7,83 |
| spr0247 | 29 | 1,2 |
| spr1506 | 29 | 1,1 |
| spr1184 | 30 | 1,18 |
| spr1291 | 31 | 1,22 |
| spr1303 | 31 | 0,97 |
| spr1452 | 33 | 0,96 |
| spr1946 | 34 | 0,88 |
| spr0083 | 35 | 1,1 |
| spr0986 | 35 | 0,72 |
| spr1042 | 36 | 4,46 |
| spr1697 | 36 | 1,07 |

Dargestellt ist die Übergangsregion von 18 bis 36 Basenpaaren Hybridisierungs-Identität der R6-Oligos im TIGR4-Genom. Die Ratios sind als R6-TIGR4-Verhältnis angegeben. Bei 29 Basen kann ein Übergang der Spezifität erkannt werden.

Der R6 – TIGR4-Vergleich weist auch darauf hin, dass eine große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieses Chipexperiments und der Wirklichkeit, wie sie durch einen Vergleich beider Genome gegeben ist, vorhanden ist. Brueckner *et al.* (2004) haben einen ausführlichen Vergleich beider Genomsequenzen durchgeführt und identifizierten 1973 Gene des *S. pneumoniae* R6, die auch im TIGR4-Genome vorhanden sind. Von diesen Genen zeigten 18 Oligos im Hybridisierungsexperiment falsch negative Resultate, d.h. obwohl die Gene in beiden Genomen vorhanden sind, waren deren Oligos aber spezifisch für einen Organismus (siehe Tabelle 3.9). Im umgekehrten Fall wurden 26 Gene in der Veröffentlichung identifiziert, die als R6-spezifisch beschrieben wurden, deren Oligosequenzen aber zu > 60% (> 30 Basen der 50mer-Oligos) im TIGR4-Genom vorkommen und dadurch Hybridisierungssignale um 1 zeigten (siehe Tabelle 3.9).

**Tab. 3.9: Vergleich des R6 – TIGR4-Experiments mit einem Vergleich der beiden Genome**

| Falsch negative Resultate | | | Falsch positive Resultate | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Oligo | Hybridisierungs-Identität der R6-Oligos im TIGR4-Genom | Ratio (R6/TIGR4) | Oligo | Hybridisierungs-Identität der R6-Oligos im TIGR4-Genom | Ratio (R6/TIGR4) |
| spr0581 | 13 | 4,45 | spr1184 | 30 | 1,18 |
| spr0470 | 14 | 2,52 | spr0986 | 35 | 0,72 |
| spr1210 | 15 | 2 | spr1716 | 39 | 0,83 |
| spr1199 | 15 | 2,11 | spr1187 | 46 | 1,85 |
| spr0416 | 16 | 1,99 | spr0496 | 46 | 0,9 |
| spr1462 | 17 | 4,63 | spr0314 | 48 | 0,67 |
| spr1179 | 17 | 5,39 | spr0313 | 48 | 0,82 |
| spr1556 | 17 | 6,07 | spr1186 | 48 | 1,16 |
| spr0121 | 17 | 13,42 | spr0042 | 48 | 0,63 |
| spr1129 | 18 | 2,18 | spr0988 | 48 | 0,74 |
| spr1023 | 19 | 2 | spr0225 | 48 | 1,34 |
| spr0310 | 19 | 4,74 | spr1198 | 49 | 0,81 |
| spr0910 | 20 | 2,9 | spr1197 | 49 | 0,91 |
| spr0465 | 20 | 3,37 | spr0312 | 49 | 0,97 |
| spr0730 | 20 | 3,47 | spr0497 | 49 | 0,79 |
| spr1483 | 20 | 5,61 | spr0495 | 49 | 0,8 |
| spr0791 | 20 | 7,13 | spr0311 | 50 | 0,93 |
| spr0098 | 29 | 2,09 | spr1196 | 50 | 1,36 |
| | | | spr0109 | 50 | 1,41 |
| | | | spr0041 | 50 | 0,55 |
| | | | spr1675 | 50 | 0,6 |
| | | | spr0987 | 50 | 0,64 |
| | | | spr1555 | 50 | 0,78 |
| | | | spr1060 | 50 | 1,1 |
| | | | spr1536 | 50 | 1,72 |

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den *S. pneumoniae* R6 – TIGR4-Hybridisierungsexperimenten im Vergleich zu den Genomsequenzvergleichen aus Brueckner *et al.* (2004). In der linken Hälfte der Tabelle sind falsch negative Resultate aufgelistet. Diese Gene sind für beide Organismen als vorhanden beschrieben, jedoch sind die 50mer-Oligos nur in R6 present. Dementsprechend war das Ratio zu Gunsten von R6. In der rechten Hälfte der Tabelle sind falsch positive Resultate aufgeführt. Diese Gene sind als variabel (grau untelegt) oder nicht im TIGR4-Genom vorhanden (weiß unterlegt) beschrieben. Jedoch sind die Sequenzen der Oligos im TIGR4-Genom vorhanden, so dass im Hybridisierungsexperiment Ratios um 1 erzielt wurden.

Diese Daten verdeutlichen, dass ein Oligo pro Gen nicht ausreichend ist, um Genome exakt zu vergleichen. Aufgrund der Spezifität eines 50mer-Oligos für ein Gen, sollten Systeme bevorzugt werden, die mehrere Oligos pro Gen haben oder PCR-basierte Features aufweisen. Für Transkriptomanalysen ist dieses Oligo-Set jedoch geeignet, da das Transkriptom aus dem Genom des *S. pneumoniae* R6-Organismus stammt und hier die Spezifität eines Oligos für ein Gen bzw. cDNA gewährleistet ist. Die Kreuzhybridisierung der Oligos ist für Transkriptomanalysen vernachlässigbar, kann aber durch Variation der Hybridisierungs-bedingungen reduziert werden. Diese kann aber nicht ausgeschlossen werden, da 49 Oligos zu > 98% identisch zu anderen Genomsequenzen sind.

### 3.6.2 Herstellung der Biochips

Die Herstellung der Biochips erfolgte mit dem SpotArray$^{TM}$24 Microarray Spotting System von PerkinElmer durch das Kontaktverfahren (siehe Kapitel 2.15). Hierbei wird durch einen Pin, der einen Schlitz in der Spitze trägt, Flüssigkeit aus einer Mikrotiterplatte aufgenommen und durch mechanischen Kontakt mit dem Slide wieder abgegeben. Es wurden 20 Slides in einem Spottingvorgang mit SMP3-Pins von Telechem bespottet. Die Aufnahme der Flüssigkeiten durch die Pins erfolgt durch Kapillarkräfte in den Schlitz der Pins. Die Abgabe wird durch Adhäsionskräfte der Flüssigkeiten zu den Slides ausgeführt. Eine Kontrolle der Aufnahme und Abgabe der Flüssigkeiten findet nicht statt. Deshalb sollte davon ausgegangen werden, dass die Spots bei dem Kontakt-Spotting-Verfahren nicht aus gleichen Flüssigkeitsvolumina hervorgegangen sind. Diese unterschiedlichen Spottingvolumina stellen aber kein Problem dar, denn jede Hybridisierung ist ein relativer Vergleich der mRNA-Menge. Das Verhältnis zwischen den hybridisierten Proben ist unabhängig von den Spottingvolumina.

Die verwendeten Oligos besaßen an ihrem 5'-Ende einen Amino-C6-Linker, der als reaktive Gruppe auf Aldehyd- oder Epoxy-Slides fungieren kann. In einer wässrigen Umgebung werden dadurch kovalente Iminbindungen (Schiff'sche Basen) gebildet.

Ein Fehlen von Spots konnte dadurch gesehen werden, dass die Biochips gegen das Licht gehalten und mit bloßem Auge abgesucht wurden. Die Biochips wurden nicht verwendet, wenn mehr als 0,5 % der Spots fehlten (23 von 4608 Spots). Eine weitere Qualitätskontrolle wurde durch Hybridisierung mit genomischer *S. pneumoniae* R6 DNA oder Cy3-Nonameren durchgeführt, die alle Spots erfassen sollte. Diese Hybridisierungen geben sowohl Aufschluss über die Anwesenheit der Spots als auch über die Signalstärke, die mit diesen Spots erzielt werden können. Zusätzlich können Crossing-over-Probleme, welche durch Verschleppung von Oligos auf nachfolgende Spots entstehen, detektiert werden. Das Ergebnis einer typischen Hybridisierung mit genomischer DNA ist in Abb. 3.24 wiedergegeben. Es zeigt die Signalintensitäten aller Spots, die durch Hybridisierung mit *S. pneumoniae* R6 DNA erzielt wurden.

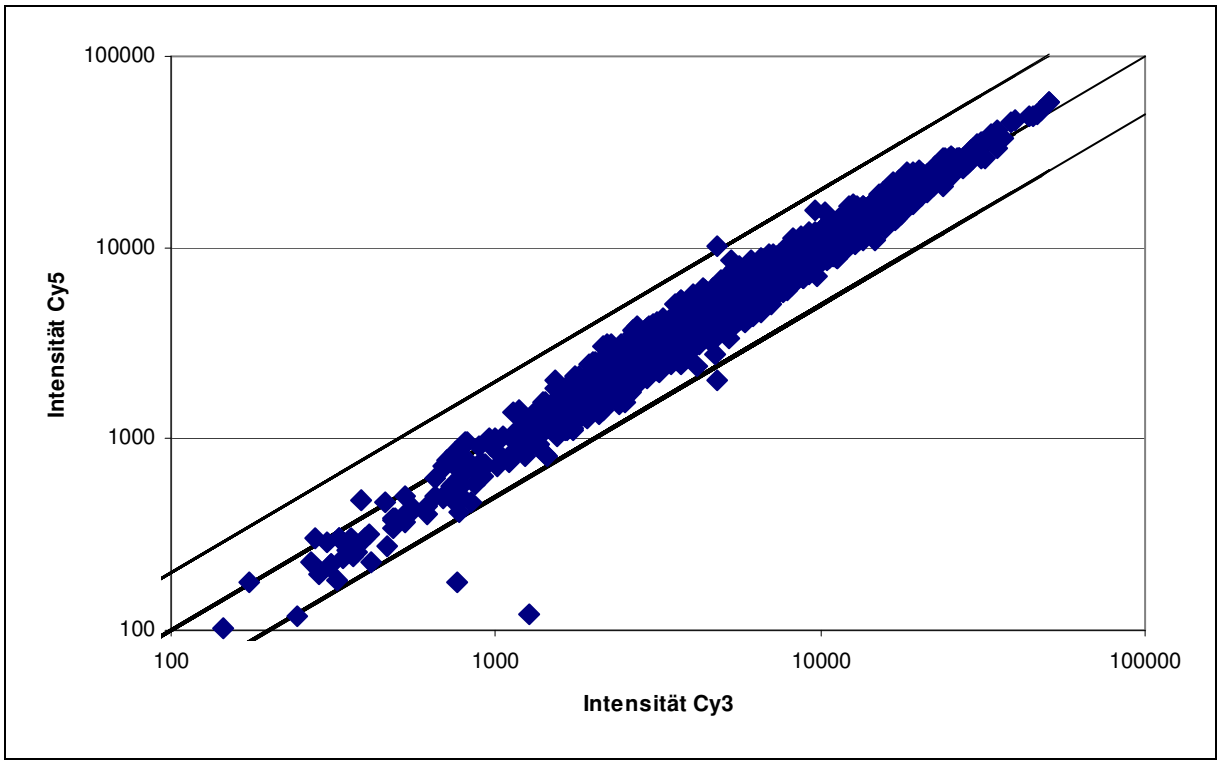



**Abb. 3.24: Qualitätskontrolle von Biochips mit genomischer DNA**
Dargestellt sind die normalisierten Signalintensitäten (siehe 2.19) einer Hybridisierung mit genomischer *S. pneumoniae* R6 DNA. Die DNA wurde in 2 Ansätzen mit Cy3 und mit Cy5 markiert. Diese wurden mit dem manuellen Hybridisierungsverfahren (siehe 2.17.1) hybridisiert. Die Abszisse zeigt die Intensität von Cy3, die Ordinate die Intensität von Cy5. Die drei Linien stellen die 1:1-Linie (Mitte) und die 2-fachen Unterschiede dar.

Die Signalintensitäten, welche in Abb. 3.24 gezeigt sind, liegen um die Diagonale. Die Diagonale stellt die 1:1-Linie dar, welche gleiche Signalstärken von Cy3 und Cy5 repräsentiert. Abb. 3.24 zeigt, dass die Signalstärken von ca. 1000 bis 40000 verteilt waren. Diese Unterschiede in den Signalstärken können durch die Markierung, durch unterschiedliche Spottingvolumina oder durch die Hybridisierung entstanden. Da die Markierung aber reproduzierbar und unabhängig vom Fluorophor durchgeführt werden konnte, ist wahrscheinlich die Markierung von spezifischen Sequenzabschnitten unterschiedlich. Geringe Signalintensitäten unterliegen generell einer höheren Variabilität, da bei diesen kleinste Artefakte oder falsche Spoterkennung große Auswirkungen haben. In Abb. 3.24 waren alle Spots mit Signalintensitäten von unter ca. 600 wahrscheinlich aufgrund der geringen Intensität nicht aussagekräftig. Allerdings wurden diese Spots nicht wegen ihrer geringen Intensität entfernt, da diese durch ihre höhere Variabilität weniger reproduzierbar sind und somit hohe „False Discovery Rate"-Werte (FDR) aufweisen werden (siehe 2.19). 5 Spots (von 4609 Spots) lagen außerhalb des 2-fachen Unterschiedbereiches. Diesen wurde aber keine erhöhte Aufmerksamkeit zugemessen, da durch Wiederholungen dieser Hybridisierung keine reproduzierbaren Ausreißer erhalten wurden.
Crossing-over – das Verschleppen von Oligos auf nachfolgende Spots – war in sehr geringen Maßen immer vorhanden und ließ sich auch durch intensives Waschen der Pins nicht eliminieren. Das Crossing-over war in aller Regel so gering, dass es zwar detektierbar, aber vernachlässigbar war. Die Quantität des Crossing-over wurde empirisch nach einer Hybridisierung bestimmt und die Qualität der Biochips danach beurteilt. Für eine vollständige Eliminierung des Crossing-over müsste eine andere Waschtechnik der Pins nach jedem Spotzyklus, z.B. durch Reinigung in einem Ultraschallbad, benutzt werden.
Die Deposition der Oligos funktionierte bei einer regelmäßigen Reinigung des Printkopfes und der Pins problemlos. Die Bindung der Oligos an das Substrat (Epoxy-Oberfläche) resultierte bei einer Oligokonzentration von 50 µM in ausreichenden Signalstärken. Die

Hybridisierung von genomischer DNA oder Nonameren als Qualitätskontrolle führte bei Spotting-Fehlern wie z.B. einer Dysfunktion des Waschprozesses oder bei Pinverschlüssen, zu einer ressourcenschonenden frühen Erkennung des Problems. Dadurch wurde Hybridisierungsmaterial nicht auf fehlerhaften Biochips eingesetzt.

### 3.6.3 Herstellung der Hybridisierungssonde

Die Herstellung der Hybridisierungsproben wurde durch den Einbau von Fluoreszenz-markierten dCTPs durchgeführt (siehe Kapitel 2.16). Für die Markierung von RNA wurde ein Kit benutzt. Die Qualität der Hybridisierungsproben wurde spektralphotometrisch und durch Größenauftrennung beurteilt. Die Analyse im Spektralphotometer (siehe 2.16.3) gibt Aufschluss über das Verhältnis von eingebauten Fluoreszenz-markierten Nukleotiden zu normalen Nukleotiden. Hierfür wurde die Extinktion bei 550 nm für Cy3 und bei 650 nm für Cy5 mit der Extinktion bei 260 nm für DNA verglichen. Das genaue Berechnungsverfahren ist in Kapitel 2.16.3 angegeben. Ein typisches Verhältnis liegt bei ca. 30 für Cy3 und ca. 50 für Cy5. Cy3-dCTP wurde, wahrscheinlich aufgrund der sterischen Gegebenheiten, immer besser eingebaut als Cy5-dCTP.

Die Größenauftrennung von markierten Nukleinsäuren wurde mit der Mikrogel-Technik durchgeführt (siehe Kapitel 2.9). Hierbei wird ein Agarosegel auf einem Objektträger gegossen, welches nach der Elektrophorese eingetrocknet und im Biochip-Scanner analysiert werden kann. Als Größenstandard dienten markierte PCR-Produkte. Eine typische Größenverteilung von markierter cDNA und markierter genomischer DNA ist in Abb. 3.25 sichtbar.

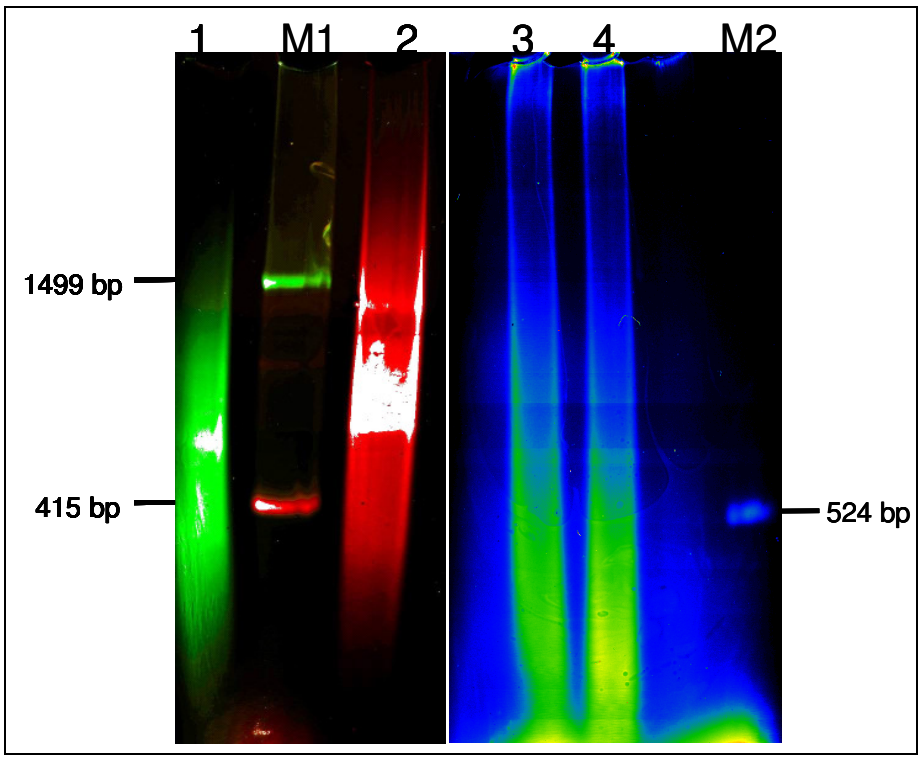



**Abb. 3.25: Größenverteilung markierter Nukleinsäuren**

Dargestellt sind Nukleinsäuren (1, 2 = cDNA; 3, 4 = genomische DNA), die mit Fluoreszenz-farbstoffen (Cy3 = grün, Cy5 = rot) markiert wurden. Aufgetrennt wurden diese markierten Nukleinsäuren mit der Mikrogel-Technik (siehe 2.9). Als Größenstandard dienten markierte PCR-Fragmente (M1, M2). Aufgetragen wurden 5% eines Markierungsansatzes. Blau deutet geringe Intensität an.

Die Größenverteilung von markierten Nukleinsäuren in Abb. 3.25 zeigt ein Gemisch an produzierten Fragmenten. Das Gemisch war bei der cDNA von 200 bis 1800 bp verteilt. Dies entspricht der erwarteten Größenverteilung um einen Mittelwert von 600 bp (Bowtell und Sambrook, 2003). Die durchschnittliche Größe von markierter genomischer DNA lag über der von markierter cDNA. Hier war ein Schmier von der Geltasche bis zu den ungebundenen Nukleotiden zu erkennen. Die größeren im Gel sichtbaren Fragmente sind wahrscheinlich doppelsträngige Fragmente, welche sich aus markierten kurzen und nicht markierten längeren DNA-Stücken zusammensetzten. Die cDNA war im Vergleich zu genomischer DNA einzelsträngig. Deshalb erfolgte bei der cDNA keine Retardierung durch nicht markierte Fragmente. Es ist auch erkennbar, dass genomische DNA weniger intensiv markiert wurde als cDNA.
In dieser Arbeit wurde die Methode der Mikrogel-Technik nach Lage *et al.* (2002) modifiziert, um die Qualität von markierter Nukleinsäure zu überprüfen. Dabei bestätigte sich, dass die DNA aufgrund ihrer höheren Komplexität (Doppelsträngigkeit, Größe) schlechter markiert werden kann als RNA. Beide Markierungsverfahren lieferten aber ausreichende Signalstärken.

### 3.6.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde entweder mit der manuellen (siehe Kapitel 2.17.1) oder mit der maschinellen Methode (siehe Kapitel 2.17.2), die erst später zur Verfügung stand, durchgeführt. Da beide Methoden für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente verwendet wurden, soll in diesem Abschnitt auf die Unterschiede zwischen den Methoden eingegangen werden. Die Hybridisierung kann nur durch die anschließende Datenanalyse beurteilt werden. Ein erster Eindruck von einer Hybridisierung gibt die Intensitätsverteilung über den gesamten Biochip wieder. Eine ungleichmäßige Verteilung mit Bereichen geringerer Intensität deutet eine misslungene Hybridisierung an. Diese Intensitätsverteilung wurde mit dem „Distribution Plot“ in der ScanArray®Express-Software analysiert. Weiterhin können Schmiere auf dem Biochip durch Fehler bei der Hybridisierung entstehen. Generell wurden Biochips mit einer zu starken Intensitätsverteilung oder mit Schmieren verworfen.
Bei der Datenaquisition durch den Scanvorgang wurde durch Justierung der Photomultiplier Tube (PMT)-Stärke darauf geachtet, keine bzw. wenig gesättigte Pixel zu erzeugen. Gesättigte Pixel erscheinen weiß und haben das Maximum an möglicher Intensität. Da dies aber nur das Maximum und nicht die wirkliche Intensität darstellt, geht Information verloren. Es wurde deshalb vermieden, gesättigte Pixel zu erzeugen.
Für einen Vergleich der Hybridisierungen mit der manuellen und der maschinellen Methode wurden die Intensitäten der Spotreplikate auf einem Biochip analyisert. In einer Scatter-Abbildung (siehe Abb. 3.26) sind die Cy3-Signalintensitäten der beiden Spots gegenüber gestellt. Die Ergebnisse, die mit dieser Darstellung erzielt wurden, sind rein technischer Natur, da für biologische Ergebnisse immer Cy3 gegen Cy5 verglichen wird und in dieser Abbildung nur Cy3-Signale aufgetragen sind.
Weiterhin wurde die Korrelation der Signalintensitäten zwischen den beiden Spotreplikaten gemessen. Dafür wurde der Pearson-Korrelations-Koeffizient r benutzt. Dieser ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Datensätzen. R kann Werte von –1 (negativer linearer Zusammenhnag) bis +1 (positiver linearer Zusammenhang) annehmen. Werte von 0 bedeuten, dass kein linearer Zusammenhang vorhanden ist.

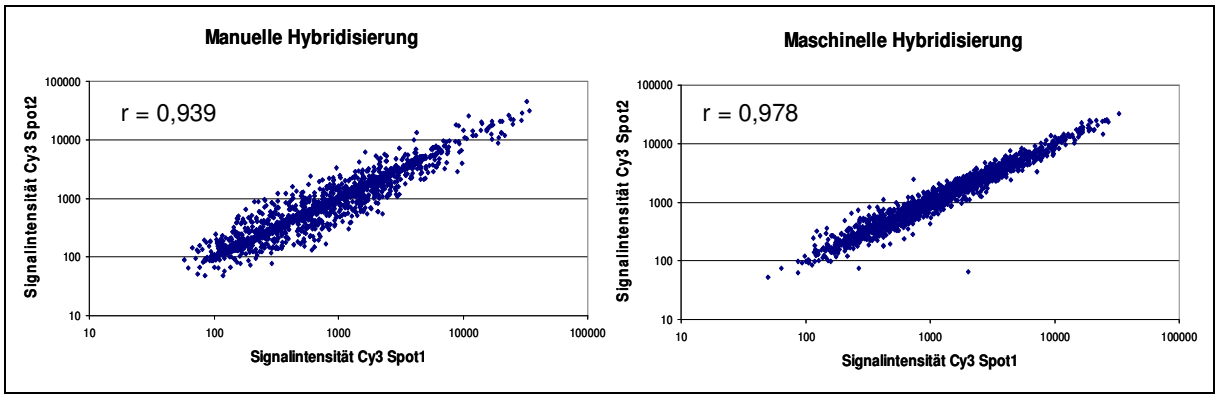



**Abb. 3.26: Vergleich der manuellen mit der maschinellen Hybridisierungsmethode**
Dargestellt sind die Cy3-Signalintensitäten von einem Biochip nach einer Hybridisierung. Hybridisiert wurden Cy5-markierte cDNA von R6 und Cy3-markierte cDNA von KP3 (Cia „ON"). Die Markierungsansätze wurden geteilt und manuell bzw. maschinell hybridisiert. Jedes Oligo wurde zweimal auf einen Slide gespottet. In dieser Abb. sind die Cy3-Signalintensitäten der beiden Spots eines Oligos miteinander verglichen. Die durchschnittliche Signalintensität betrug bei der manuellen Hybridisierung 1574 und bei der maschinellen Hybridisierung 2339. r stellt den Pearson-Korrelationskoeffizienten dar. Auf der Abszisse sind die Cy3-Signalintensitäten von Spot1, auf der Ordinate die Cy3-Signalintensitäten von Spot2 aufgetragen.

Die Streuung der Signalintensitäten war bei der manuellen Methode deutlich größer als bei der maschinellen Hybridisierung (siehe Abb. 3.26). Dieses spiegelte sich auch in dem Pearson-Korrelationskoeffizienten wider, welcher bei der maschinellen Hybridisierung größer war als bei der manuellen. Zusätzlich war die durchschnittliche Signalintensität bei der maschinellen Hybridisierung mit 2339 größer als bei der manuellen mit 1574. Dadurch erfüllten auch mehr Spots die Qualitätskriterien, so dass mehr Spots ausgewertet werden konnten (1956 bei der maschinellen und 1747 bei der manuellen Hybridisierung). Die hier gezeigten Daten beruhen auf Cy3-Signalintensitäten. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Cy5-Intensitäten beobachtet. Die Verbesserungen, die schon vorher mit einer aktiven Mischung während der Hybridisierung beschrieben wurden (Schaupp *et al.*, 2005), konnten damit bestätigt werden.
Beide Hybridisierungsverfahren kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Die maschinelle Hybridisierungstechnik war erst ab Mitte 2005 verfügbar, so dass ca. 2/3 der hier vorgestellten Ergebnisse mit der manuellen Methode durchgeführt wurden. Die Ergebnisse, welche mit der manuellen Methode generiert wurden, sind aber ebenso aussagekräftig, wie die Ergebnisse, die mit der maschinellen Methode erzielt wurden. Nur die Statistik kann Aussagen über die Qualität der Daten geben. Für beide Hybridisierungstechniken wurden die gleichen statistischen Kriterien angewandt. Damit liegt der Nachteil der manuellen Methode in der geringeren Signalintensität und in der kleineren Anzahl an auswertbaren Spots, die die Qualitätskriterien für eine weitere Analyse erfüllen.

### 3.6.5 Datenaquisition und Datenanalyse

Um die Streuung zwischen den Replikaten auf einem Biochip zu quantifizieren, wurden deren Cy3- oder Cy5-Intensitäten gegeneinander in einem Scatter-Graph dargestellt (Abb. 3.27 A und 3.26). Weiterhin lässt sich mit dieser Methode die Varianz durch den Dye-Swap (Abb. 3.27 B) und auch die Varianz zwischen den beiden unabhängigen Kulturen schätzen (Abb. 3.27 C). Ein Dye-Swap ist die wechselseitige Markierung mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen. In einer Hybridisierung mit RNA A und RNA B wird RNA A mit Cy3 und RNA B mit Cy5 markiert. Der Dye-Swap von dieser Hybridisierung wäre dann RNA A Cy5 und RNA B Cy3. Für eine genaue Aussage wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r berechnet, der ein Maß für eine lineare Abhängigkeit von zwei Datensätzen darstellt (1 = 100% Korrelation, 0 = keine Korrelation). Dieser Koeffizient wurde in Excel berechnet und auf verschiedenen Ebenen analysiert (siehe Abb. 3.28). Ebene 1 vergleicht die Intensität der

beiden Spots auf einem Slide. Ebene 2 spiegelt den Dye-Swap wider und vergleicht Cy3- und Cy5-Intensität. Ebene 3 ist ein Vergleich zwischen zwei unabhängigen Kulturen.
Die höhere Schwankungsbreite in Abb. 3.27 B beruhte auf dem unterschiedlichen Einbau der Farbstoffe Cy3 und Cy5 sowie auf weiteren technischen Variabilitäten (Pipettierungenauigkeiten, Hybridisierung, Spoterkennung). Diese Unterschiede akkumulieren zusammen mit der biologischen Varianz und sind in Abb. 3.27 C wiedergegeben.

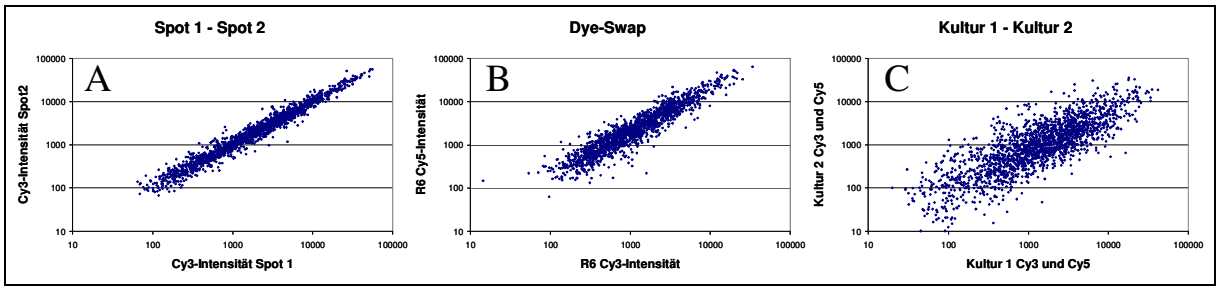



**Abb. 3.27: Varianz auf verschiedenen Ebenen der Datenanalyse**
Dargestellt sind die Intensitätsdaten der in Abb. 3.28 dargestellten Vergleichsebenen. (A) veranschaulicht den Vergleich der Cy3-Intensitäten zwischen den beiden Spots für ein Oligo auf einem Slide (r = 0,978) (Ebene 1). In (B) ist die unterschiedliche Signalstärke zwischen den Cy3- und Cy5-Signalen von einer RNA (= von zwei unterschiedlichen Biochips) (r = 0,933) dargestellt (Ebene 2) und (C) zeigt die Intensitätsunterschiede zwischen zwei biologischen Replikaten (r = 0,720) (Ebene 3), die unabhängig voneinander kultiviert, markiert und hybridisiert wurden.

Es ist anhand der Streuung der Punkte zu erkennen, dass eine zunehmende Schwankung der Intensitäten von Abb. 3.27 A zu C vorhanden war. Dies ist auch an den Korrelationswerten ersichtlich. In Abb. 3.27 A beträgt r 0,978, in Abb. 3.27 B 0,933 und in Abb. 3.27 C 0,72. Die Ausschlusskriterien für diese Berechnungsebenen sind in Abb. 3.28 dargestellt. Es wurden Biochips aus der Analyse entfernt, wenn Ebene 2 unter 0,75 und Ebene 3 unter 0,55 lag. Jedoch wurden keine einzelnen Spots aus der Analyse eliminiert, da diese bei zu hoher Streuung als nicht signifikant durch die verwendete Statistik identifiziert wurden.

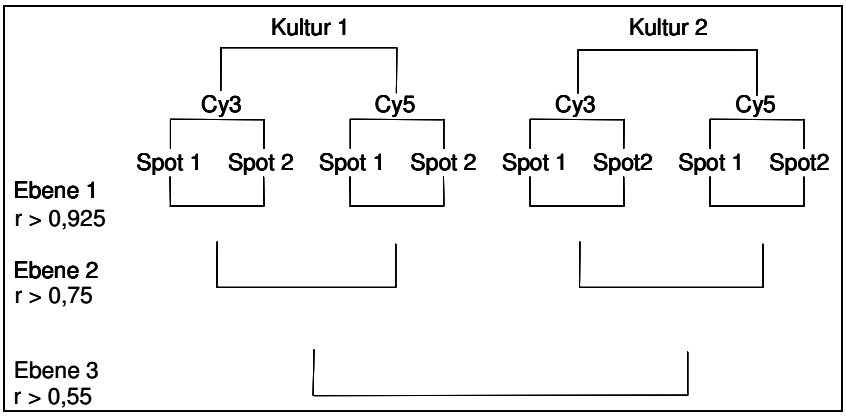



**Abb. 3.28: Berechnungsebenen für den Korrelationskoeffizienten r**
Dargestellt sind verschiedene Ebenen, auf denen der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet wurde. Ebene 1 vergleicht die Intensitäten eines Fluoreszenzfarbstoffs (entweder Cy3 oder Cy5) von zwei Spots mit demselben Oligo auf einem Slide. Ebene 2 stellt zwei Slides gegenüber, deren Hybridisierungsproben (= identisches Ausgangsmaterial) unterschiedlich markiert wurden (Cy3- gegen Cy5-Markierung). Ebene 3 vergleicht zwei Proben, die aus unabhängigen Kulturen stammten.

Zur Auswahl des Ratios 2 als Selektionskriterium für signifikante Gene wurde die Abhängigkeit der Anzahl an signifikanten Genen von dem Schwellenwert empirisch untersucht. Hierzu wurde die Anzahl selektierter Gene gegen den Schwellenwert aufgetragen (Abb. 3.29). Entscheidend für die Wahl des Schwellenwertes ist ein „Ellenbogen“ in der aufgezeichneten Linie, der einen Übergang als Annäherung an die X-Achse andeutet. Das Ellenbogenkriterium wird überwiegend bei der Bestimmung der minimalen Anzahl von Clustern oder von Faktoren (Scree-Test) eingesetzt. In Abb. 3.29 wurde der Ellenbogenknick bei 1,8 gedeutet. Um Schwankungen zwischen Experimenten niedrig zu halten, wurde zur Sicherheit trotzdem ein Schwellenwert von 2 ausgewählt. Dieser wurde für vier Experimente empirisch mit einem Schwellenwert von 2 bestimmt und danach für alle weiteren Experimente angewandt.

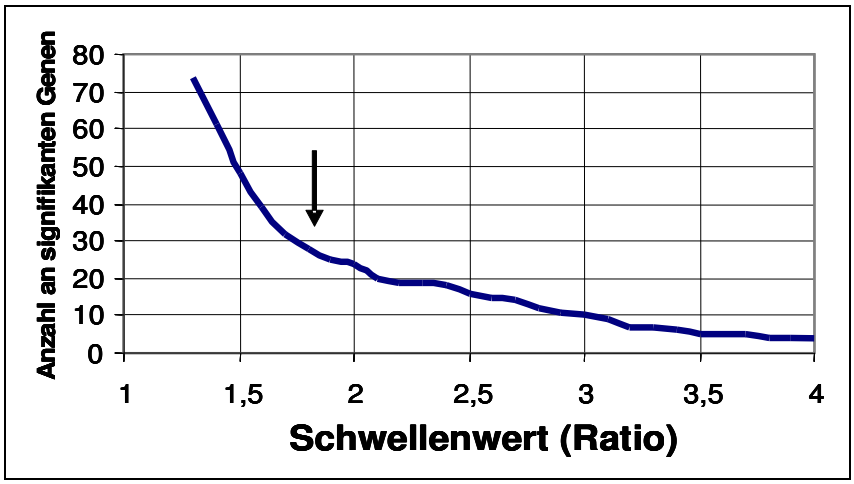



**Abb. 3.29: Die Anzahl an selektierten Genen in Abhängigkeit vom Schwellenwert (Ratio).**
Dargestellt ist die Anzahl an signifikaten Genen (signifikant = höher als Schwellenwert, FDR < 1%) in Abhängigkeit vom Schwellenwert. Die gezeigten Daten stammten von einem Experiment (R6 – KP1 N40 CpH8-Medium). Bei niedrigem Schwellenwert werden mehr Gene selektiert als bei hohem. Auf der Abszisse ist der Schwellenwert, auf der Ordinate die Anzahl selektierter Gene angegeben. Ein „Ellenbogen“ (Pfeil) kennzeichnet den Übergang der Linie. Der Schwellenwert ist das Minimum, ab dem die Gene selektiert wurden.

Die Identifizierung von unterschiedlich transkribierten Genen wurde mit Hilfe von statistischen Methoden durchgeführt (siehe Kapitel 2.19). Das Verfahren, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf der Methode von Benjamini und Hochberg (1995). Es schätzt die FDR (false discovery rate; siehe Kapitel 2.19). Als Basis der Berechnungen dienten die Ratios der einzelnen Experimente (insgesamt maximal 8 Ratio-Werte). Als alternativer Berechnungsweg für die Identifizierung von unterschiedlich transkribierten Genen wurde der t-Test auf der Basis der Intensitäten erprobt. Hierfür wurden die Intensitäten Varianz-stabilisiert (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003). Diese Methode kombiniert die Kalibrierung von mehreren Arrays und die Varianz-Stabilisierung. Das Ergebnis einer Varianz-Stabilisierung ist in Abb. 3.30 dargestellt. In dieser Abb. sind die Daten in Abhängigkeit ihrer Intensitäten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aufgetragen.

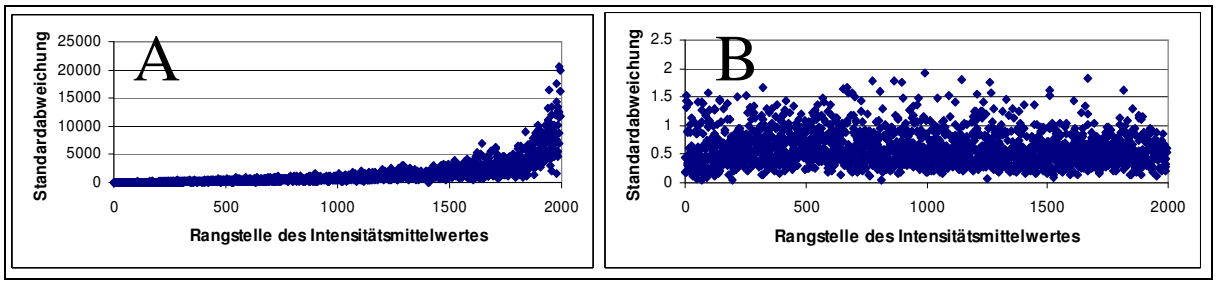



**Abb. 3.30: Varianzstabilisierung von Intensitätsdaten**
Dargestellt sind die Intensitäts-Daten von einem Experiment (R6 – KP1 N40 CpH8-Medium). Die Daten auf der Abszisse sind nach der Intensität aufgelistet, wobei die Gene von eins mit der niedrigsten Intensität aufsteigend abgebildet sind; die Ordinate stellt die Standardabweichung dar; (A) vor der Varianzstabilisierung, (B) nach der Varianzstabilisierung (siehe 2.19).

Die Abhängigkeit der Standardabweichung von den Intensitäten ist deutlich aus Abb. 3.30 ablesbar. Diese ist nach der Varianzstabilisierung (Abb. 3.30 B) nicht mehr zu erkennen.
Anschließend wurden mit einem zweiseitigen t-Test die Gene auf differentielle Transkription geprüft. Die erhaltenen P-Werte wurden wiederum adjustiert nach Benjamini und Hochberg (1995) (siehe 2.19). In Tabelle 3.10 sind die erhaltenen adjustierten P-Werte nach Berechnungen mit Intensitäten oder Ratios für ein Experiment (R6 – KP1 (Cia „OFF“) N10 CpH8-Medium) aufgetragen. Ein Gen wurde als signifikant unterschiedlich transkribiert beurteilt, wenn nach einem Berechnungsverfahren der adjustierte P-Wert unterhalb von 0,01 lag (= FDR < 1%).

**Tabelle 3.10: Berechnung von unterschiedlich transkribierten Genen nach zwei verschiedenen Berechnungsverfahren**

| Gen | Ratio | P-Wert nach Ratioverfahren | P-Wert nach Intensitäts-Verfahren |
|---|---|---|---|
| *spr0931* | 8,02 | 0,0005 | 0,0116 |
| *spr0707* | 34,99 | 0,0006 | $1{,}71*10^{-07}$ |
| *spr0708* | 13,71 | 0,0030 | 0,7358 |
| *spr0627* | 1,51 | 0,0035 | 0,7359 |
| *spr0782* | 5,15 | 0,0035 | 0,1056 |
| *spr0866* | 0,47 | 0,0062 | 0,3649 |
| *spr0448* | 2,64 | 0,0078 | 0,2409 |
| *spr0684* | 0,78 | 0,0078 | 0,9996 |
| *spr1144* | 0,76 | 0,0078 | 0,9996 |
| *spr1492* | 1,22 | 0,0078 | 0,9996 |
| *spr2046* | 10,46 | 0,0085 | 0,2749 |
| *spr0279* | 2,01 | 0,0088 | 0,2475 |
| *spr1155* | 0,52 | 0,0088 | 0,9996 |
| *spr1440* | 0,75 | 0,0088 | 0,9996 |
| *spr2002* | 1,42 | 0,0088 | 0,9996 |
| *spr1616* | 1,31 | 0,0091 | 0,9996 |
| *spr0280* | 2,51 | 0,0091 | 0,4084 |
| *spr1879* | 0,74 | 0,0095 | 0,9996 |
| *spr2045* | 79,52 | 0,0099 | 0,0249 |

Dargestellt sind die Gene, welche in einem Experiment (R6 – KP1 (Cia „OFF“) N10 CpH8-Medium) als statistisch unterschiedlich transkribiert wurden. Für Berechnungen der adjustierten P-Werte wurde die Methode nach Benjamini und Hochberg (1995) benutzt. Aufgetragen sind die adjustierten P-Werte, welche auf Basis der Ratios oder Intensitäten berechnet wurden.

Aus Tabelle 3.10 wird ersichtlich, dass eine Berechnung von unterschiedlich transkribierten Genen auf Basis der Ratios wesentlich mehr Gene identifiziert hat, als auf Basis der Intensitäten. Die 19 Gene aus Tabelle 3.10 wurden auf der Grundlage der Ratiodaten gefunden. Nur eins (*spr0707*) der 19 Gene konnte auch mit der Intensitätsmethode selektiert werden. Da zusätzlich zu dieser statistischen Analyse nur die Gene ausgewählt wurden, deren Ratio > 2 oder < 0,5 waren, wurde das statistische Verfahren basierend auf den Ratios für die Identifizierung von unterschiedlich transkribierten Genen benutzt.
Dem statistischen Verfahren kommt eine besondere Bedeutung zu, denn dieses beurteilt die Qualität der erzielten Daten. Da auch statistische Methoden Vor- und Nachteile haben, ist es wichtig, eine Methode für alle Experimente gleich anzuwenden. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode auf der Basis der Ratio-Daten werden mehr Gene als signifikant beschrieben, als auf der Basis von Intensitäten. Diese Methode ist vertretbar, da weitere Ausschlusskriterien, wie z.B. die Größe des Ratios (> 2 oder < 0,5), die Anzahl an signifikanten Genen reduzieren.

## 3.7 Globale Transkriptionsanalysen zur Untersuchung des Cia-Regulons

Die Mikroarray-Technik wurde in dieser Arbeit benutzt, um differentiell transkribierte Gene zu identifizieren, die primär oder sekundar durch das Cia-System reguliert werden können.
1994 wurde das Cia-System als Resistenzdeterminante gegen Cefotaxim entdeckt (Guenzi *et al.*, 1994). Eine Vernetzung des Cia-Systems mit der Kompetenz wurde in diesem Zusammenhang beobachtet. Dieser Phänotyp konnte in globalen Transkriptionsstudien von Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004) auf Transkriptionsebene bestätigt werden. In diesen Studien konnten auch weitere Cia-regulierte Gene beobachtet werden, die in dieser Arbeit zu einem minimalen Cia-Regulon zusammengefasst wurden (siehe Tab. 1.1). Diese Experimente wurden aber entweder mit unvollständigen (Sebert *et al.*, Mascher *et al.*, Dagkessamanskaia *et al.*) und z.T. nicht mehr erhältlichen Chips (Mascher *et al.*) oder mit anderen Stämmen oder Medien (Sebert *et al.*, Dagkessamanskaia *et al.*) durchgeführt. Es war daher wichtig mit dem neu zur Verfügung stehenden Oligonukleotid-Array und den Abteilungs-eigenen Stämmen die Experimente z.T. zu wiederholen und, da in der Arbeit von Mascher *et al.* nur eine begrenzte Anzahl an Chips zur Verfügung stand, zu erweitern.
In Kapitel 3.7.1 werden Experimente vorgestellt, die die Transkription des Cia-Regulons im Wildtyp R6 untersuchten. Zunächst sollte die globale Transkription in Abhängigkeit der Wachstumsphasen analysiert werden. Dafür wurden zu fünf Zeitpunkten von einer wachsenden Kultur Zellen geerntet und miteinander verglichen. Außerdem wurde im zweiten Teil des Kapitels 3.7.1 der Einfluss des Mediums (THB- versus CpH8-Medium) im R6-Wildtyp analysiert.
Die unter 3.7.2 vorgestellten Experimente sollten einerseits die differentielle Transkription des Cia-Regulons bestätigen und andererseits eine detailliertere Beschreibung des Cia-Regulons erlauben.
Cia-regulierte Gene sollten durch Vergleich von Mutanten, die unterschiedliche Aktivierungszustände des Cia-Systems enthielten, identifiziert werden. Das Cia-System wurde durch Integration einer Resistenzkassette in das *ciaR*-Gen inaktiviert (KP1-Mutante) (Zähner, 1999). Ein erhöhter Aktivierungszustand ist für das $CiaH_{C306}$ T230P-Allel beschrieben (KP3-Mutante) (Guenzi *et al.*, 1994; Mascher *et al.*, 2003). Eine Inaktivierung des *ciaH*-Gens (KP2-Mutante) führt wahrscheinlich nur zu einer leichten Aktivierung des Cia-System, da diese Mutation alleine eine Erhöhung der Resistenz, jedoch keine Veränderung in der Kompetenz verursacht (Zähner *et al.*, 2002). In Kapitel 3.8 sind die Transkriptionsanalysen von spontanresistenten Labormutanten dargestellt, von denen z.T. schon eine Aktivierung des Cia-Systems gezeigt wurde (siehe Kapitel 3.3). In Kapitel 3.10 wird die mögliche Aktivierung des Cia-Systems durch Zellwandstress (Vancomycin-Behandlung) vorgestellt.

**Durchführung und Auswertung von Mikroarray-Experimenten**
Für die folgenden Versuche war es wichtig möglichst identische Versuchsbedingungen einzuhalten, obwohl nicht alle Experimente an demselben Tag durchgeführt werden konnten. Deshalb wurden die zu vergleichenden Kulturen in demgleichen Medium angezogen und bei der entsprechenden Nephelo geerntet. Für Wachstumskurven-Experimente in CpH8-Medium waren dies die fünf Zeitpunkte Nephelo 10, 20, 40, 70 und 130. Für alle weiteren Experimente in diesem Medium wurden die Zellen in der midexponentiellen Wachstumsphase bei Nephelo 40 geerntet. Für Experimente in THB-Medium wurden die Kulturen bei Nephelo 30 geerntet, da die maximale Zelldichte in THB-Medium geringer war als in CpH8-Medium. Für den Vergleich von CpH8- und THB-Medium wurde eine R6-Kultur bei Nephelo 40 in CpH8-Medium mit einer R6-Kultur bei Nephelo 30 in THB-Medium verglichen.

Alle Experimente wurden zweifach und unabhängig voneinander durchgeführt. Jede RNA-Präparation aus einer unabhängigen Kultur wurde geteilt und markiert (einmal mit Cy3 und einmal mit Cy5). Diese unterschiedliche Markierung nennt sich „Dye-Swap“. Insgesamt wurden maximal 8 und mindestens 5 Datenpunkte pro Oligo zu jedem Experiment ermittelt und statistisch ausgewertet.

### 3.7.1 Das Cia-Regulon im Wildtyp R6

**Die Transkription des Cia-Regulons innerhalb einer R6 – Wachstumskurve**

Als Vorraussetzung für Experimente, die das Transkriptionsprofil von verschiedenen Stämmen über die Wachstumskurve vergleichen, wurde die globale Transkription von *S. pneumoniae* R6 zu fünf verschiedenen Zeitpunkten in einer Wachstumskurve untersucht (Abb. 3.31). Dadurch sollte geklärt werden, ob das Cia-System in verschiedenen Wachstumsphasen unterschiedlich aktiviert wird. Mit diesem Experiment wurde für jedes Gen ein Transkriptionsmuster mit fünf Werten erstellt. Hierfür wurde die Gesamt-RNA zu einem Zeitpunkt gegen die RNA der Mischung aus den fünf Wachstumspunkten („common reference sample“) verglichen, so dass nur Unterschiede in der Expression zu einem Zeitpunkt gegen den Transkriptionsdurchschnitt über die Wachstumskurve nachweisbar waren. Wenn zu einem der fünf Zeitpunkte ein Gen signifikant mit einem 2-fachen Unterschied transkribiert wurde, wurde dieses in die Tabelle 6.1, welche sich im Anhang befindet, aufgenommen. Unterschiede, die signifikant (FDR < 1%) sind, wurden **fett** markiert.
Von den im Durchschnitt 1900 ausgewerteten Genen zeigten 1720 keine > 2-fache signifikante Transkriptionsänderung. Insgesamt umfasst die Tabelle 6.1 180 Gene (8,9 %) mit 214 signifikanten Werten über 1 und 84 signifikanten Werten unter 1. Die Transkription des minimalen Cia-Regulons über die Wachstumskurve von *S. pneumoniae* R6 ist in Tabelle 3.11 dargestellt. Als Kontrolle wurden 40 ribosomale Proteine und die *comCDE*- und *comX*-Gene des Kompetenzregulons ausgewählt. Es wurde erwartet, dass die Transkription der ribosomalen Proteine konstant über die Wachstumskurve verläuft und nur in der stationären Phase bei N130 nachlässt. Aufgrund des Quorum-Sensing-Charakters der Kompetenz sollte die Transkription der Kompetenzgene zu einem Zeitpunkt während der logarithmischen Wachstumsphase einen Höchststand erreichen und danach abfallen.

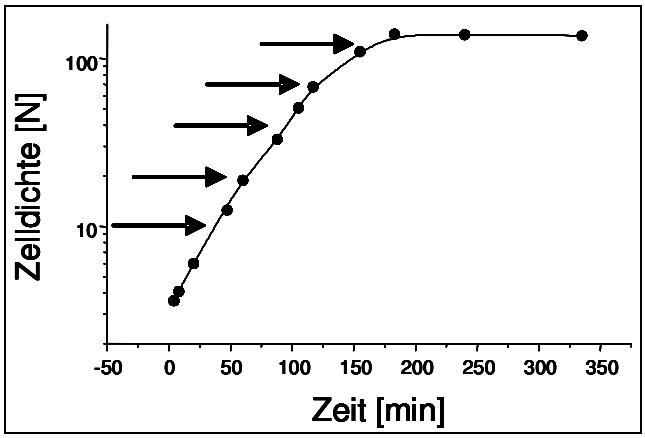



**Abb. 3.31: Wachstum von *S. pneumoniae* R6 in CpH8-Medium**
Dargestellt ist das Wachstum von *S. pneumoniae* R6 in CpH8-Medium. Die Pfeile zeigen die 5 Zeitpunkte, zu denen die RNA isoliert und gegen die „common reference sample“ verglichen wurde. Die Ordinate stellt die Zelldichte in Nephelo und die Abszisse die Zeit in Minuten dar.

**Tab. 3.11: Transkription von Genen des minimalen Cia-Regulons in Abhängigkeit der Wachstumsphase in *S. pneumoniae* R6**

| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0259* | *manN* | 0,68 | 0,93 | 1,44 | 1,10 | 0,62 |
| *spr0260* | *manM* | 0,77 | 1,25 | 1,27 | 1,06 | 0,42 |
| *spr0261* | *manL* | 0,82 | 1,52 | 1,15 | 0,83 | 0,69 |
| *spr0343* | *hk03* | 1,28 | 1,17 | 0,95 | 0,89 | 1,51 |
| *spr0344* | *rr03* | 1,29 | 1,80 | 0,90 | 0,95 | 1,27 |
| *spr0707* | *ciaR* | 1,21 | 1,00 | **0,65** | **0,55** | **1,93** |
| *spr0708* | *ciaH* | 1,40 | 0,95 | **0,54** | **0,53** | 1,67 |
| *spr0782* | hypoth. | 1,44 | 0,73 | **0,32** | **0,36** | 2,14 |
| *spr0931* | hypoth. | 1,54 | 0,82 | **0,42** | **0,38** | 2,00 |
| *spr1145* | *licC* | 0,69 | 0,67 | 0,62 | 0,97 | 3,06 |
| *spr1146* | *licB* | 0,54 | **0,49** | **0,47** | 0,61 | **4,03** |
| *spr1147* | *pck* | 0,48 | **0,50** | **0,49** | 0,60 | **4,43** |
| *spr1148* | hypoth. | 0,41 | **0,43** | 0,60 | 0,72 | 4,56 |
| *spr1149* | hypoth. | 0,81 | **0,41** | 0,43 | 0,74 | **4,65** |
| *spr1538* | *axe* | **1,55** | 1,13 | 0,72 | 0,58 | 1,29 |
| *spr1916* | *malP* | 1,76 | 1,30 | **0,32** | **0,27** | 0,91 |
| *spr1917* | *malM* | 1,90 | 1,39 | **0,28** | **0,21** | 0,69 |
| *spr1979* | *dltD* | 1,31 | 1,17 | 0,92 | 0,96 | 0,94 |
| *spr1980* | *dltC* | 0,85 | 0,98 | 0,86 | 0,85 | 1,28 |
| *spr1981* | *dltB* | 0,99 | 1,09 | 0,92 | 0,84 | 1,51 |
| *spr1982* | *dltA* | 0,96 | 1,30 | 0,92 | 0,70 | 1,57 |
| *spr2045* | *htrA* | 1,86 | 0,86 | 0,47 | **0,38** | 1,78 |
| *spr2046* | *spo0J* | 1,21 | 1,00 | **0,45** | **0,33** | 1,71 |
| rib. Proteine | | 1,09 (0,14) | 0,97 (0,11) | 1,20 (0,12) | 1,10 (0,13) | 0,26 (0,08) |
| Kompetenz-Regulon | *comCDE comX* | 1,68 (0,19) | 0,94 (0,08) | 0,99 (0,05) | 0,95 (0,005) | 0,30 (0,01) |

Dargestellt ist das Verhältnis der Transkription zu einer definierten Zelldichte gegen den Transkriptionsdurchschnitt der gemessenen Zelldichten. Signifikant unterschiedlich transkribiert Gene sind **fett** markiert. Die Daten sind als Ratio von spezifischer Nephelo durch die Mischung aus fünf Zeitpunkten dargestellt. Zur besseren Übersicht sind Werte > 1,4 rot (> 2 dunkelrot) markiert, Werte < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) markiert und Werte zwischen 0,7 und 1,4 ohne farbliche Markierung. Die Werte in Klammern stellen die einfache Standardabweichung des Mittelwertes aller ribosomalen Proteingene bzw. der 4 Kompetenzgene dar.

Die *ciaRH*-, *spr0782*, *spr0931*, *axe*, die *mal*- und *htrA*/*spo0J*-Gene wurden zu den Zelldichten Nephelo 40 und 70 deutlich weniger transkribiert als zu den anderen drei Zelldichten. Für die *lic*-Gene gilt ein ähnliches Phänomen für die Zelldichten N20 und N40. Das Transkriptionsverhältnis der dargestellten Gene variierte zu den Zelldichten N40 und N70 von 0,27 (*spr1916*) bis 0,65 (*spr0707*). Dies stellte einen 6-fachen bzw. 3-fachen Unterschied in der Transkription zu der Zelldichte mit der stärksten Transkription dieser Gene dar. Diese 14 Gene zeigten zu Nephelo 10 bzw. 130 die stärkste Transkription. Die *lic*-Gene sind besonders auffällig, denn sie wurden zu N130 ca. 8-fach stärker transkribiert als in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Gene *spr1916* und *spr1917* wurden zu Nephelo 10 am stärksten von allen Proben transkribiert. Die *spr0259* – *spr0261* Gene zeigten das umgekehrte Transkriptionsmuster. Diese Gene hatten zu Nephelo 20 bzw. 40 die stärkste Transkription und zu Nephelo 10 bzw. 130 die geringste. Die *dlt*-Gene scheinen nicht oder nur sehr schwach dieser Regulation zu unterliegen, denn deren Transkriptionsunterschiede über die Wachstumskurve waren nur sehr minimal. Lediglich die *spr1981*- und *spr1982*-Gene zeigten in der Stationärphase (N130) einen Transkriptionsanstieg auf.
Im Gegensatz zu den Genen des minimalen Cia-Regulons wurden die ribosomalen Kontrollgene in der exponentiellen Phase nahezu unverändert transkribiert. Aber beim Übergang in die stationäre Phase, in der weniger Zellwachstum stattfindet, reduzierte sich die Transkriptionsstärke auf ein Viertel. Die Kompetenzgene wurden in der frühen exponentiellen Phase (N10) deutlich stärker transkribiert als zu den anderen Zelldichten und reduzierten sich in der stationären Phase auf ein Drittel der durchschnittlichen Transkription.

Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass das Cia-Regulon innerhalb einer R6-Wachstumskurve stark reguliert wurde. Dabei unterlagen die einzelnen Operons wahrscheinlich zusätzlich noch einer weiteren Regulation. Die *man*-, *lic*, *mal*- und *dlt*-Transkriptionseinheiten wichen von dem Regulationsmuster der *ciaRH*-, *spr0782*, *spr0931* und *htrA*/*spo0J*-Gene ab. Dementsprechend konnte mit einer Clusteranalyse, welche mit dem Expander-Programm (Shamir *et al.*, 2005) durchgeführt wurde, keine aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich Ähnlichkeit der Transkription zum Cia-Regulon generiert werden. Die meisten Gene des minimalen Cia-Regulons wurden zu zwei Zelldichten in der exponentiellen Wachstumsphase weniger transkribiert. Diese Regulation hebt sich deutlich von der Regulation der Kontrollgene ab.

**Vergleich der Transkription von R6-Zellen gewachsen in CpH8- und THB-Medium**

Das CpH8-Medium ist ein definiertes, semisynthetisches Medium, welches sich durch die Anwesenheit von bestimmten Spurenelementen und Ergänzungsstoffen auszeichnet. Das THB-Medium enthält neben Glukose und einer einfachen Salzlösung die nicht definierten Komponenten Pepton und Rinderherzinfusion. Aus diesen beiden Komponenten stammen die essentiellen Substanzen, die *S. pneumoniae* zum Wachstum in THB-Medium benötigt. Das Wachstum von *S. pneumoniae* unterscheidet sich in den beiden Medien in der Generationszeit und der maximalen Zelldichte. In CpH8-Medium wächst *S. pneumoniae* R6 etwas schneller und zu einer höheren Zelldichte als in THB-Medium (Abb. 3.33). Auch Cia-phänotypische Beobachtungen unterscheiden sich in den beiden Medien. Von Lange *et al.* (1999) wurde eine verstärkte Autolyse bei Inaktivierung des Cia-Systems (KP1-Mutante) in THB-Medium beschrieben, die in CpH8-Medium nicht beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.33). Auch das Kompetenzverhalten ist in diesen Medien verschieden. Während der Wildtyp R6 und die KP1-Mutante in CpH8-Medium ungefähr gleich kompetent werden, ist in THB-Medium nur noch die KP1-Mutante (Cia „OFF“) kompetent. In β-Glaktosidase-Assays konnte eine Cia-abhängige Genexpression von *dltA* beim Übergang in die stationäre Phase nur in THB-Medium, nicht jedoch in CpH8-Medium gezeigt werden (Mascher, 2001). Daraus wurde gefolgert, dass bei dem Übergang in die stationäre Phase ein möglicher Stimulus durch das Cia-System transduziert wurde, während das Cia-System in CpH8-Medium weniger aktiviert wurde. Die Identifizierung von Genen, die in den beiden Medien unterschiedlich transkribiert werden, könnte klären, warum Cia-abhängige Phänotypen in den beiden Medien z.T. sehr verschieden sind.

Hier wird nun der globale Transkriptionsvergleich zwischen zwei R6-Kulturen, gewachsen in CpH8- und in THB-Medium, vorgestellt. Dabei wurde eine R6-Kultur aus dem CpH8-Medium bei N40 mit einer R6-Kultur aus dem THB-Medium bei N30 verglichen. Es wurden Gene selektiert, die einen signifikanten Transkriptionsunterschied von > 2 oder < 0,5 aufwiesen.

Die mindestens 2-fach differentiell transkribierten Gene und deren Transkriptionsunterschiede sind in der Tabelle 6.2 im Anhang aufgeführt. Es wurden 97 Gene identifiziert, die stärker in CpH8 transkribiert wurden, und 47 Gene, die verstärkt in THB transkribiert wurden. Diese Gene wurden in 4 Gruppen eingeteilt: zum einen die Gene des Kompetenz-Regulons nach Peterson *et al.* (2004), und zum anderen drei Gruppen von Genen, deren Produkte am Stickstoff-Metabolismus, am Zuckermetabolismus bzw. am Transport beteiligt sind.

In Abb. 3.31 sind die Transkriptionsverhältnisse der Gene des Kompetenz-Regulons dargestellt. Diese Gene wurden in CpH8-Medium im Durchschnitt 30-fach stärker exprimiert als in THB-Medium. Die Transkriptionsunterschiede sind äquivalent zu der Nicht-Transformierbarkeit von R6 in THB- und zu der Transformierbarkeit in CpH8-Medium.

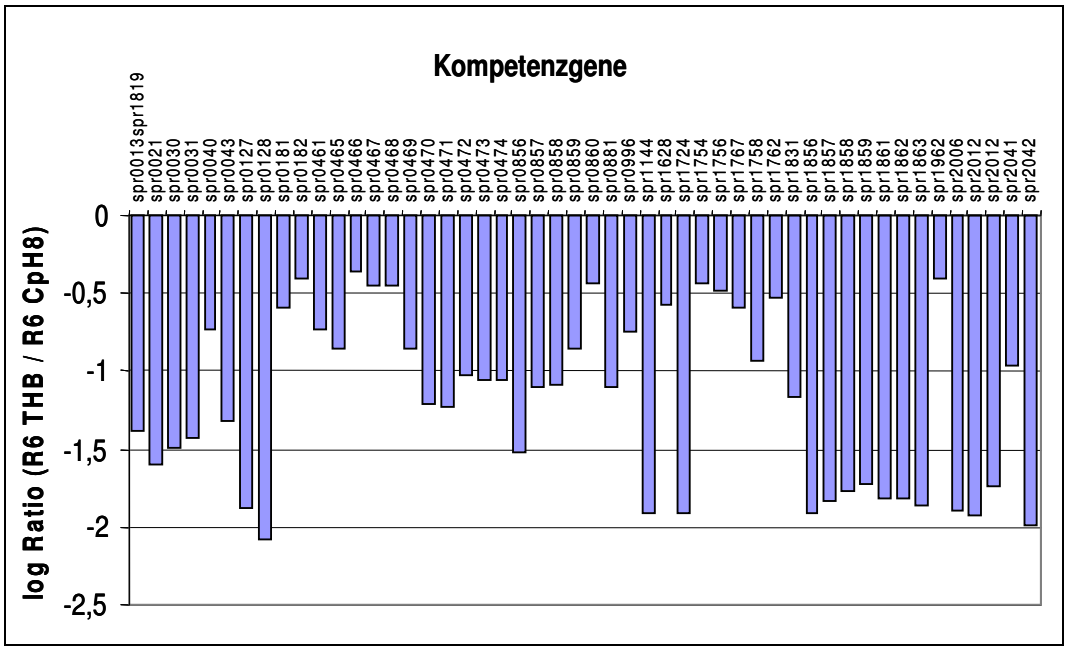



**Abb. 3.31: Transkription der Gene des Kompetenz-Regulons in Abhängigkeit vom Medium**

Dargestellt sind die Gene des Kompetenz-Regulons nach Peterson *et al.* (2004). Verglichen wurden R6-Kulturen aus der midexponentiellen Wachstumsphase in THB- und CpH8-Medium. Die Ordinate gibt das $\log_{10}$ (R6 THB / R6 CpH8)-Verhältnis wieder. Auf der Abszisse sind die einzelnen Gene aufgelistet.

Drei größere funktionelle Gruppen – neben den Kompetenzgenen - wurden unterschiedlich zwischen CpH8 und THB-Medium transkribiert: Gene, die a) für Proteine des Stickstoff-Metabolismus, b) für Zuckerverwertung und –transport und c) für Transportproteine (ABC-Transporter) kodieren (siehe Abb. 3.32).

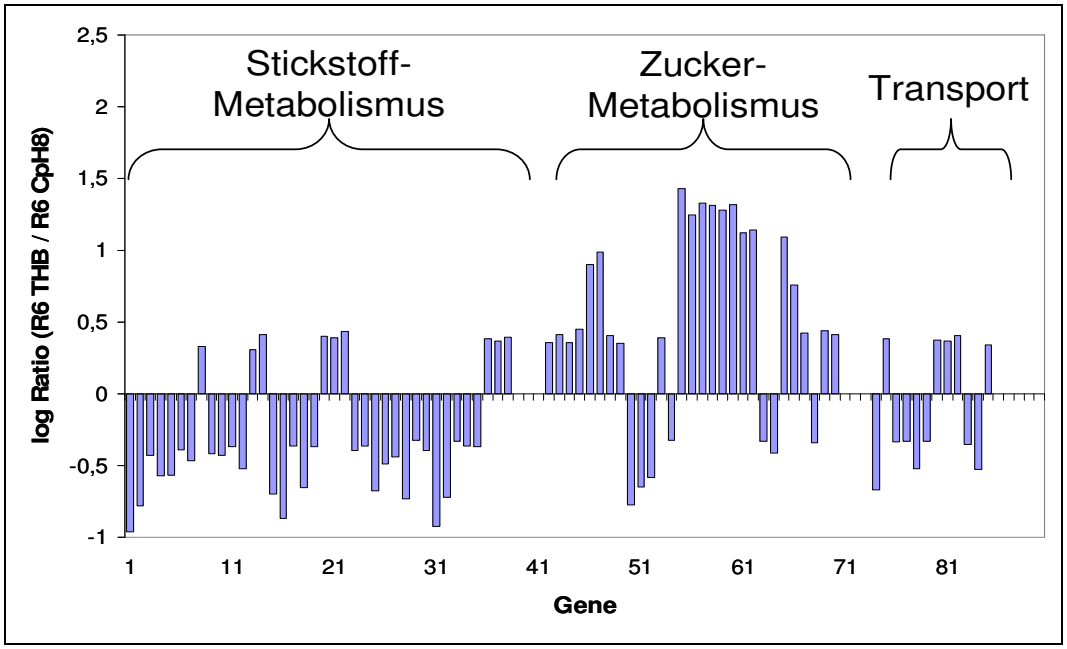



**Abb. 3.32: Transkription von Genen aus 3 funktionellen Gruppen in Abhängigkeit vom Medium**

Verglichen wurden R6-Kulturen aus der midexponentiellen Wachstumsphase aus THB- und CpH8-Medium. Dargestellt sind die signifikant unterschiedlich transkribierten Gene, die nicht zum Kompetenz-Regulon gehören. Auf der Abszisse ist die Anzahl der Gene, auf der Ordinate das $\log_{10}$ (R6 THB / R6 CpH8)-Verhältnis aufgetragen. Ein Wert von 0 bedeutet keinen Transkriptionsunterschied. Es wurden zwei unabhängige Kulturen untersucht, von denen die Mittelwerte aufgetragen sind.

Die Gene des Stickstoff-Metabolismus, welche das *pur*-, *pyr*- und *gln*-Operon einschließen, wurden überwiegend weniger in THB-Medium transkribiert als in CpH8-Medium. Die Gene der Zuckerverwertung, welche viele PTS-Gene aber auch das *gal*- und *lac*-Operon beinhalten, sind wahrscheinlich den spezifischen Zuckerbedingungen des jeweiligen Mediums angepasst und zeigten keine einheitliche Transkriptionsänderung. Die *lacABCDTFEG*-Gene wurden ca. 20-fach höher in THB-Medium transkribiert als in CpH8-Medium. Dies entsprach den Zusammensetzungen der Medien: im CpH8-Medium findet sich keine Laktose, während im THB-Medium wahrscheinlich mehr Laktose vorhanden ist, auch wenn die genaue Konzentration aufgrund der undefinierten Bestandteile nicht bestimmt werden kann. Die vierte größere funktionelle Gruppe stellen die Transporter dar. Unter diesen sind Transporter für Spurenelemente, wie z.B. Mangan, Kobalt oder Phosphat (ca. 2-fach erhöht in THB), aber auch für komplexere Substrate wie z.B. verzweigte Aminosäureketten oder Oligopeptide (2-fach reduziert in THB).
Unter den Genen, welche keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, sind Gene der Eisenaufnahme, *cylB*, *fer* und *hemH*, welche 2,2 – fach niedriger in THB transkribiert wurden als in CpH8. Auch dies entsprach wahrscheinlich den jeweiligen physiologischen Umständen der Zellen, da aufgrund der komplexen Zusammensetzung des THB-Mediums die $Fe^{2+}$-Konzentration höher sein könnte als im CpH8-Medium (1,54 nmol $Fe^{2+}$). Weiterhin finden sich die Gene des TCS03 (2-fach höher in THB), *spr0413* (2,5-fach niedriger in THB) und *spr1874* (marR-homologer Regulator; 2-fach höher in THB), die als Cia-reguliert gefunden werden konnten (siehe Kapitel 3.7.2).
Die Gene des minimalen Cia-Regulons sind in Tabelle 3.12 dargestellt. Diese wurden bis auf die *man*-Gene (*spr0259* – *spr0261*) in THB-Medium ca. 2-fach stärker transkribiert als in CpH8-Medium.

**Tabelle 3.12: Die Transkription des minimalen Cia-Regulons in Abhängigkeit vom Nährmedium**

| Gennummer | Genname | Ratio |
|---|---|---|
| *spr0259* | *manN* | 0,86 |
| *spr0260* | *manM* | 1,07 |
| *spr0261* | *manL* | 1,72 |
| *spr0343* | *hk03* | **0.41** |
| *spr0344* | *rr03* | **0.41** |
| *spr0707* | *ciaR* | 0,79 |
| *spr0708* | *ciaH* | 0,70 |
| *spr0782* | Hypothetisch | 0,66 |
| *spr0931* | Hypothetisch | **0,44** |
| *spr1145* | *licC* | 0,94 |
| *spr1146* | *licB* | 0,98 |
| *spr1147* | *pck* | **0,65** |
| *spr1148* | Hypoth. | 0,67 |
| *spr1149* | Hypoth. | **0,62** |
| *spr1538* | *axe* | 0,72 |
| *spr1916* | *malP* | 0,53 |
| *spr1917* | *malM* | 0,49 |
| *spr1979* | *dltD* | 0,65 |
| *spr1980* | *dltC* | 0,62 |
| *spr1981* | *dltB* | 0,62 |
| *spr1982* | *dltA* | 0,61 |
| *spr2045* | *htrA* | 0,62 |
| *spr2046* | *spo0J* | 0,57 |

Dargestellt sind die Gene des minimalen Cia-Regulons und ihre Transkriptionverhältnisse im R6-Wildtyp gewachsen in CpH8- und THB-Medium. Die Ratios sind als CpH8 / THB-Verhältnisse aufgetragen. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant. Zur besseren Übersicht sind Werte > 1,4 rot, Werte < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) markiert und Werte zwischen 0,7 und 1,4 ohne farbliche Markierung.

Zusammenfassend demonstrieren die aufgeführten Ergebnisse die starke Unterschiedlichkeit der Medien CpH8 und THB und damit die physiologischen Bedürfnisse der Zellen in den beiden Medien. So wurden bei einem Vergleich in der midexponentiellen Wachstumsphase 7,1% der Gene von *S. pneumoniae* mindestens 2-fach unterschiedlich transkribiert. Die Kompetenzgene wurden 30-fach stärker in CpH8- als in THB-Medium transkribiert. Dies entspricht den phänotypischen Beobachtungen zur Kompetenz von R6 in den beiden Medien: *S. pneumoniae* R6 entwickelt in CpH8-Medium Kompetenz, in THB-Medium nicht. Cia-phänotypische Beobachtungen korrelierten auch mit der Transkriptionsstärke des Cia-Systems. Das minimale Cia-Regulon wurde in THB ca. 2-fach stärker transkribiert als in CpH8-Medium. Das Cia-System scheint in THB-Medium mehr aktiviert zu sein als in CpH8-Medium.

### 3.7.2 Cia-abhängig transkribierte Gene in der CiaR-Deletionsmutante

Wie in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei dem CiaR-Protein um einen transkriptionellen Regulator. Transkriptionelle Regulatoren verändern die Transkriptionsrate von ihren Zielgenen. Um die Zielgene und die Stärke ihrer Regulation zu analysieren, wurden Transkriptionsprofile von Stämmen, die sich in dem Aktivierungszustand des Cia-Systems unterscheiden, verglichen.
Das Transkriptionsprofil des Wildtyps R6 wurde gegen die Mutanten KP1 (Cia „OFF“) und KP3 (Cia „ON“) verglichen. Die KP1-Mutante enthält eine Spektinomycin-Resistenzkassette in dem *ciaR*-Gen und besitzt kein funktionierendes Cia-System mehr, da weder das CiaR- noch das CiaH-Protein hergestellt werden. Die KP3-Mutante hat eine Punktmutation in dem *ciaH*-Gen, welche einen Aminosäureaustauch von Threonin zu Prolin an der Position 230 zur Folge hat und zu einer Aktivierung des Cia-Systems führt. Da unterschiedliche Gene zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstum von *S. pneumoniae* durch das Cia-System reguliert sein können, wurden insgesamt fünf Zeitpunkte innerhalb des Wachstums von KP1 (Cia„OFF“) in CpH8-Medium ausgewählt und mit dem R6 verglichen. Zusätzlich wurden die Mutanten auch in dem THB-Medium zu einem Zeitpunkt (N30) verglichen (siehe Abb. 3.33). Um mögliche Unterschiede deutlicher hervortreten zu lassen, wurden die beiden Mutanten KP1 und KP3 auch direkt miteinander und nicht einzeln zum R6 gegenübergestellt.

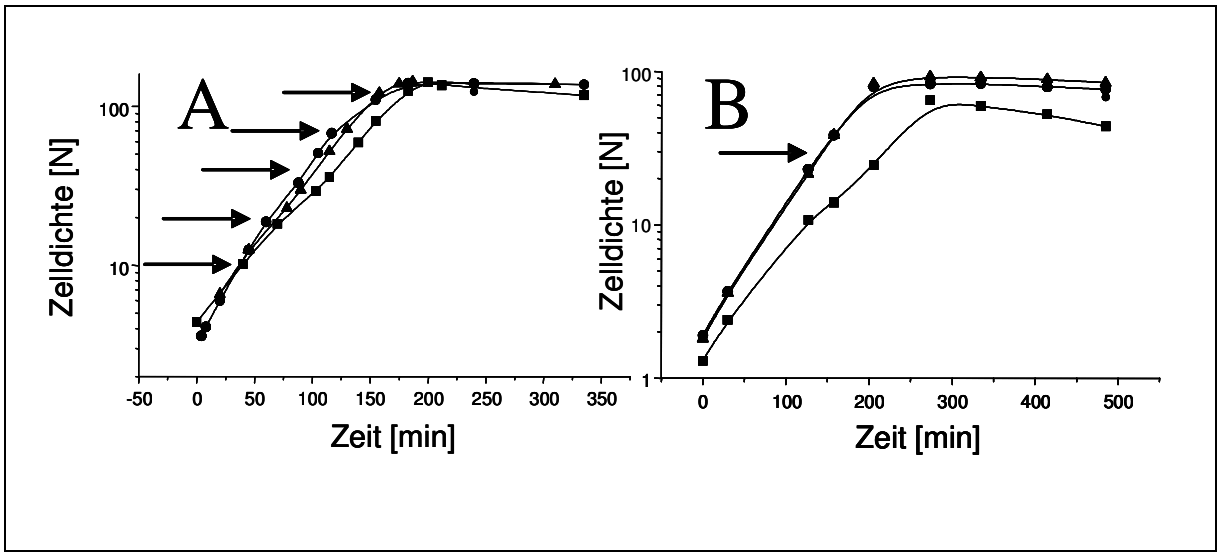



**Abb. 3.33: Wachstum von *S. pneumoniae* R6 und Cia-Mutanten in CpH8- und THB-Medium**
Eine exponentiell wachsende Bakterienkultur wurde 1:40 verdünnt und das Wachstum mittels Nephelometrie gemessen. Dargestellt sind der R6 Wildtyp (Kreis), die KP1-Mutante (Cia „OFF“, Quadrat) und die KP3-Mutante (Cia „ON“, Dreieck). Das Wachstum wurde in (A) CpH8-Medium und (B) THB-Medium verfolgt. Die Pfeile repräsentieren die Zelldichten, bei denen die Proben genommen wurden. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten, auf der Ordinate die Zelldichte in Nephelo aufgetragen.

Als Kontrolle zu diesem Experiment wurden die Gene für ribosomale Proteine ausgewählt. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 3.13 dargestellt. Alle Daten aus dieser Tabelle liegen um 1 mit einer sehr geringen Standardabweichung. Die Gene für die ribosomalen Proteine wurden also nicht Cia-abhängig reguliert. Damit sollten sich die hier gezeigten Transkriptionsunterschiede auf die genetischen und biochemischen Unterschiede der Cia-Mutanten zurückführen lassen.

**Tabelle 3.13: Transkription ribosomaler Gene in Abhängigkeit des Cia-Systems**

| | KP1 ($Cia^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 ($Cia^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *Gene für rib. Proteine* | 1,01 (0,20) | 1,11 (0,16) | 1,14 (0,14) | 1,15 (0,13) | 0,94 (0,18) | 0,82 (0,15) | 1,18 (0,19) | 1,12 (0,13) | 1,20 (0,10) |

Verglichen wurde das Transkriptom des R6-Wildtyps gegen die KP1-Mutante in CpH8-Medium (Spalten 2 bis 6) und in THB-Medium (Spalte 7) sowie gegen die KP3-Mutante in CpH8-Medium (Spalte 9) und in THB-Medium (Spalte 10). Die KP1-Mutante wurde direkt mit der KP3-Mutante verglichen (Spalte 8). Dargestellt sind die Kontrollen, welche für die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente benutzt wurden. Zu jedem Gen gibt es einen Mittelwert aus den einzelnen Messungen einer Untersuchungsbedingung. Diese Mittelwerte von 58 Genen, die für ribosomale Proteine kodieren, wurden zu einem Mittelwert zusammengerechnet. Die jeweilige Standardabweichung ist in Klammern angegeben. $Cia^{OFF}$ deutet die Inaktivierung (Cia „OFF"), $Cia^{ON}$ die Aktivierung des Cia-Systems an (Cia „ON").

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 6.3 dargestellt (siehe Anhang). Eine Gliederung der Ergebnisse anhand der Zugehörigkeit der regulierten Gene zu dem Kompetenz-Regulon (Peterson *et al.*, 2004) wurde zur besseren Übersicht durchgeführt.
Abb. 3.34 zeigt die funktionelle Gruppierung der 158 Gene, die in diesen Vergleichen als differentiell transkribiert aufgetreten sind. Neben dem Kompetenz-Regulon, dessen Regulation durch das Cia-System schon bekannt ist, konnten weitere 23 als Cia-reguliert publizierte Gene identifiziert werden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Es ist auffällig, dass zusätzlich zu den bekannten Cia-regulierten Genen und den Genen des Kompetenz-Regulons, die erwartet wurden, auch andere Gene Cia-reguliert wurden. Diese wurden in drei funktionelle Gruppen eingeordnet. Insgesamt gliedern sich diese 158 Gene in 78 Transkriptionseinheiten. Die Cia-abhängige Transkription des Kompetenz-, des Cia-Regulons und der weiteren Gene ist in den nächsten Abschnitten ausführlicher erläutert.

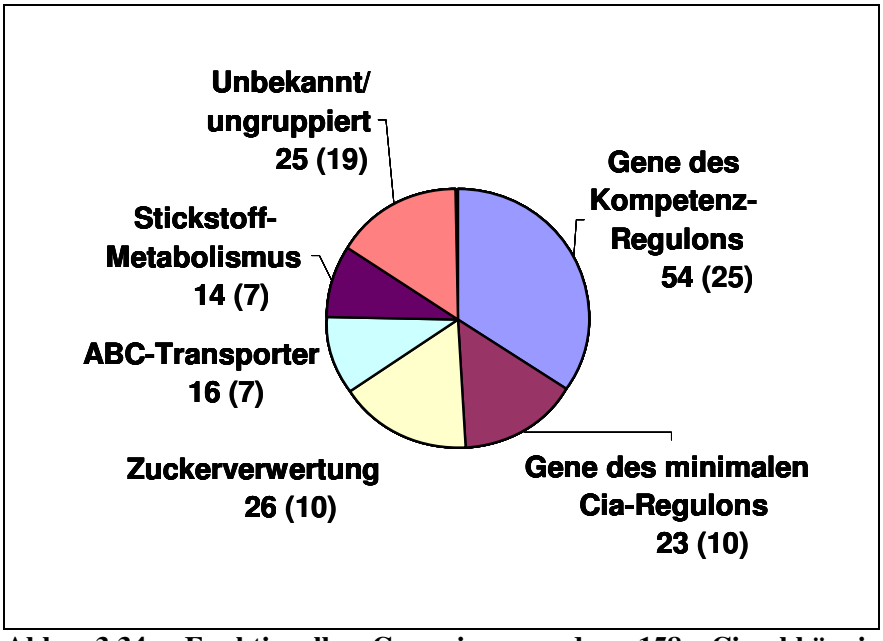



**Abb. 3.34: Funktionelle Gruppierung der 158 Cia-abhängig transkribierten Gene**

Dargestellt ist die Verteilung der Cia-abhängig transkribierten Gene nach Funktionsgruppen. Die Zahl hinter der Funktionsgruppe zeigt die Anzahl der Gene, die Zahl in Klammern die Transkriptionseinheiten. Ein Gen wurde als Cia-abhängig transkribiert erachtet, wenn es in einer der analysierten Bedingungen signifikant 2-fach unterschiedlich transkribiert wurde.

**Die Cia-abhängige Transkription des minimalen Cia-Regulons**

Die Schnittmenge der Gene, welche als Cia-reguliert publiziert wurden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004), wurden in dieser Arbeit als minimales Cia-Regulon zusammengefasst (siehe Tabelle 1.1 und 3.14). Die hier vorgestellten Experimente sollten die größte Ähnlichkeit zu der Arbeit von Mascher *et al.* (2003) aufweisen, da sowohl die gleichen Stämme als auch das gleiche Medium (CpH8 und THB) benutzt wurden. Die Gen-Gruppe des minimalen Cia-Regulons umfasst 23 Gene (10 Transkriptionseinheiten), die in Tabelle 3.14 aufgelistet sind. Diese Gruppe ist sehr einheitlich in ihrer Cia-abhängigen Transkription. Die *man*-Gene gehören zum minimalen Cia-Regulon, sind aber nicht in den hier vorgestellten Experimenten 3-fach signifikant unterschiedlich transkribiert aufgetreten. Sie wurden zur Vervollständigung mit in diese Tabelle aufgenommen. *Spr0505* wurde von Sebert *et al.* (2002) als Cia-reguliert beschrieben. Dieses Gen ist aber aufgrund seiner Funktion in Tabelle 3.17 und 3.18 aufgeführt.

**Tab. 3.14: Gene des minimalen Cia-Regulons**

| Gennummer | Genname | Mögliche Genfunktion |
|---|---|---|
| *spr0259* | *manN* | PTS, Mannose-specifisch EIID |
| *spr0260* | *manM* | PTS, Mannose-specifisch EIIC |
| *spr0261* | *manL* | PTS, Mannose-specifisch EIIAB |
| *spr0343* | hk03 | Histidinekinase |
| *spr0344* | rr03 | Responseregulator |
| *spr0707* | *ciaR* | Histidinekinase |
| *spr0708* | *ciaH* | Responseregulator |
| *spr0782* | hypoth. | hypothetisches Protein |
| *spr0931* | hypoth. | hypothetisches Protein |
| *spr1145* | *licC* | Putative Pyrophosphorylase |
| *spr1146* | *licB* | Putativer Cholin-Transporter |
| *spr1147* | *pck* | Putative Cholinkinase |
| *spr1148* | hypoth. | Putative Alkoholdehydrogenase |
| *spr1149* | hypoth. | Putative CDP-Ribitol |
| *spr1538* | *axe* | Xylanesterase 1 |
| *spr1916* | *malP* | Maltodextrin Phosphorylase |
| *spr1917* | *malM* | 4-alpha-Glucanotransferase |
| *spr1979* | *dltD* | Transmembranprotein |
| *spr1980* | *dltC* | D-Alanyl-Carrierprotein |
| *spr1981* | *dltB* | Transmembranprotein |
| *spr1982* | *dltA* | D-Alanin-Dcp-Ligase |
| *spr2045* | *htrA* | Serineprotease |
| *spr2046* | *spo0J* | Chromosomensegregationsprotein |

Die Zusammenfassung der in dieser Tabelle vorgestellten Gene orientierte sich an den Publikationen Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004). Die Gene in dieser Tabelle stellen die größte Übereinstimmung dieser Arbeiten dar.

In Tab. 3.15 ist die Abhängigkeit der Transkription dieser Gene von dem Cia-System dargestellt. Ohne das Cia-System ist die Transkription dieser Gene, mit Ausnahme der TCS03-Gene, reduziert. Aber nur *htrA* / *spo0J*, *ciaRH*, *spr0931* und *spr0782* zeigten mit Werten von > 4 sehr deutliche Unterschiede, wobei das *htrA*-Gen die stärkste Cia-Abhängigkeit mit z.T. 80-fachem Transkriptionsunterschied bei Abwesenheit des Cia-Systems (KP1) hatte.

Die TCS03-Gene (*spr0343* und *spr0344*) waren bei Abwesenheit des Cia-Systems (KP1) in ihrer Transkription leicht erhöht (ca. 2-fach) zu den Zeitpunkten N10 – N40. Zu den anderen Untersuchungsbedingungen zeigten sich keine Unterschiede. Im Vergleich zum aktivierten Zustand des Cia-Systems (KP3) wurden die meisten Gene mehr (ca. 2 – 3-fach) transkribiert. Nur die TCS03-Gene und die *lic*-Gene wiesen keinen Unterschied zur KP3-Mutante auf. Das *axe*-Gen war nur im Vergleich zu der KP3-Mutante differentiell transkribiert. In CpH8 und THB wurde *axe* sowohl bei aktiviertem Cia-System (KP3) 2 – 3-fach mehr transkribiert als

auch im Wildtyp R6. Auffällig sind die unterschiedlichen Werte, die innerhalb eines Operons erzielt wurden. Im *lic*-Operon zeigte das *spr1149*-Gen die stärkste Cia-abhängige Transkription, während das *spr1145*-Gen nur in der stationären Phase (N130) im Vergleich zu der KP1-Mutante differentiell transkribiert wurde. Eine ähnliche Beobachtung ist innerhalb des *dlt*-Operons ersichtlich. Das *dltD*-Gen wurde sogar weniger als 2-fach Cia-abhängig transkribiert. Allerdings waren die Ratios für dieses Gen immer leicht unter 2. Die *man*-Gene zeigten nur eine sehr geringe Cia-abhängige Transkription. Sie wurden nur im Vergleich zur KP3-Mutante (Cia „ON“) unterschiedlich, aber weniger als 2-fach, transkribiert.

**Tab. 3.15: Transkriptionsverhältnisse des minimalen Cia-Regulons**

| | | KP1 ($Cia^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 ($Cia^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0259* | *manN* | 0,90 | 0,65 | 0,87 | 1,09 | 0,77 | 1,00 | 0,60 | 1,90 | 1,36 |
| *spr0260* | *manM* | 1,11 | 0,83 | 0,92 | 0,89 | 0,71 | 1,15 | 0,60 | **1,89** | 1,51 |
| *spr0261* | *manL* | 0,89 | 0,81 | 1,17 | 1,29 | 1,26 | 1,05 | 0,61 | 1,38 | **1,84** |
| *spr0343* | hk03 | 1,43 | **2,50** | 1,43 | 1,25 | 1,11 | 1,25 | 1,00 | 1,11 | 1,11 |
| *spr0344* | rr03 | 1,67 | **2,50** | 1,67 | 1,11 | 1,11 | 1,25 | 1,00 | 1,00 | **1,11** |
| *spr0707* | *ciaR* | **0,03** | **0,03** | **0,05** | **0,04** | **0,05** | **0,04** | **0,02** | **2,50** | **3,33** |
| *spr0708* | *ciaH* | **0,07** | 0,08 | 0,09 | 0,10 | 0,04 | **0,10** | **0,10** | **2,50** | **3,33** |
| *spr0782* | hypoth. | **0,20** | 0,20 | 0,36 | 0,25 | 0,24 | **0,17** | **0,14** | **3,33** | **2,50** |
| *spr0931* | hypoth. | **0,13** | **0,13** | 0,34 | 0,32 | 0,17 | **0,13** | **0,12** | **2,50** | **2,50** |
| *spr1145* | *licC* | 0,83 | 0,77 | | 0,77 | 0,16 | 0,83 | 0,91 | 1,11 | 1,11 |
| *spr1146* | *licB* | 0,53 | 0,83 | 0,63 | 0,77 | 0,43 | **0,59** | **0,50** | 1,00 | **1,25** |
| *spr1147* | *pck* | 0,48 | 0,53 | 0,59 | 0,83 | 0,24 | **0,43** | 0,77 | 1,25 | **1,25** |
| *spr1148* | hypoth. | 0,48 | 0,50 | 0,53 | 0,77 | 0,22 | **0,37** | **0,50** | 1,25 | **1,43** |
| *spr1149* | hypoth. | 0,42 | **0,48** | **0,59** | 0,67 | 0,56 | **0,42** | 0,28 | 1,11 | **1,43** |
| *spr1538* | *axe* | 0,91 | 1,00 | 1,11 | 1,11 | 0,77 | 0,91 | 0,59 | 2,00 | **3,33** |
| *spr1916* | *malP* | 0,37 | **0,43** | 1,25 | 0,59 | 0,59 | **0,33** | **0,26** | **2,50** | **3,33** |
| *spr1917* | *malM* | 0,50 | 0,59 | 1,11 | 0,67 | 0,63 | **0,23** | **0,12** | **3,33** | **5,00** |
| *spr1979* | *dltD* | 0,51 | 0,67 | 0,80 | 0,91 | 0,85 | 0,49 | 0,64 | 1,72 | **1,40** |
| *spr1980* | *dltC* | 0,50 | 0,63 | 0,83 | 0,77 | 0,91 | **0,59** | **0,37** | 1,67 | **2,50** |
| *spr1981* | *dltB* | 0,59 | 0,63 | 0,63 | 1,00 | 0,83 | 0,53 | 0,45 | 1,43 | **2,50** |
| *spr1982* | *dltA* | 0,48 | 0,67 | 0,77 | 0,83 | 0,67 | 0,53 | 0,53 | 1,43 | **2,50** |
| *spr2045* | *htrA* | **0,01** | **0,03** | **0,06** | **0,09** | 0,04 | **0,03** | **0,01** | **5,00** | **5,00** |
| *spr2046* | *spo0J* | **0,10** | **0,09** | 0,13 | **0,21** | 0,14 | **0,08** | **0,05** | **5,00** | **3,33** |

Dargestellt sind die Ergebnisse von globalen Transkriptionsanalysen. Es sind die Daten der Gene aus Tabelle 3.14 gezeigt. Verglichen wurde das Transkriptom des R6-Wildtyps gegen die KP1-Mutante in CpH8-Medium (Spalten 3 bis 7) und in THB-Medium (Spalte 8) sowie gegen die KP3-Mutante in CpH8-Medium (Spalte 10) und in THB-Medium (Spalte 11). Die KP1-Mutante wurde auch gegen die KP3-Mutante verglichen (Spalte 9). Zur besseren Übersicht sind Änderungen von > 1,4 rot (> 2 dunkelrot), von < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) und zwischen 0,7 und 1,4 weiß unterlegt. Die Verhältnisse sind jeweils so dargestellt, dass die Werte von der Mutante durch die Werte von dem Wildtyp R6 dividiert wurden. Für das KP3 – KP1-Ratio wurden die Werte von KP3 durch die Werte von KP1 geteilt. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant.

Die in Tab. 3.15 dargestellten Daten lassen erkennen, dass die Gene, welche in den anderen Transkriptionsstudien identifiziert wurden, auch in diesen Experimenten eine eindeutige Cia-abhängige Transkription aufwiesen. Eine Ausnahme stellten die *man*-Gene dar, die aber z.T. auch in den anderen Studien nur sehr schwach Cia-reguliert waren. Dabei konnte *htrA* als das Gen mit der stärksten Cia-Abhängigkeit bestätigt werden. Diese Cia-Abhängigkeit der Transkription war, ebenso wie bei den anderen Genen, unabhängig von dem Medium.
Die Gene, welche bisher vereinzelt als Cia-reguliert publiziert wurden und hier nicht zum minimalen Cia-Regulon gezählt wurden, wurden nicht oder weniger als 2-fach Cia-abhängig unterschiedlich transkribiert. Trotzdem zeigten *spr0934* – *spr0937* eine Cia-abhängige Transkription sowohl im Vergleich zur KP1-Mutante (Cia „OFF“) als auch zur KP3-Mutante (Cia „ON“). Die für ABC-Transporter kodierenden Gene *spr0934* – *spr0937* wurden ca. 1,5-fach stärker in THB-Medium im Vergleich zur KP1-Mutante und ca. 1,6-fach schwächer in der KP3-Mutante transkribiert.

**Die Transkription des Kompetenz-Regulons in Abhängigkeit vom Cia-System**

Die Cia-abhängige Transkription des Kompetenz-Regulons wurde unter nicht-kompetenten (THB-Medium) und mehr kompetenteren (CpH8-Medium) Bedingungen analysiert. Die Konzentration an Rinderserumalbumin (BSA) kann die Effizienz der Transformation beeinflussen (Havarstein und Morrison, 1999; Romao *et al.*, 2006). Wie stark der Einfluss des BSA im CpH8-Medium aber auf die Transkription der Kompetenzgene ist, bleibt unklar. Jedoch zeigte der Transkriptionsvergleich zwischen R6 aus CpH8- und THB-Medium einen deutlichen Unterschied in der Transkription der Kompetenzgene auch ohne BSA. Eine Inaktivierung des Cia-Systems (KP1-Mutante) hat eine erhöhte Transformationseffizienz zur Folge, während eine Aktivierung (KP3-Mutante) zu einer dramatischen Reduktion der Transformationseffizienz führt. Dieser Zusammenhang konnte auf Transkriptionsebene z.T. durch Mascher *et al.* (2003) bestätigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kompetenzgene wurden aufgrund ihrer CSP-Induzierbarkeit zum Kompetenz-Regulon gruppiert (Peterson *et al.*, 2004). In der Tabelle 3.16 sind die in dieser Arbeit Cia-abhängig transkribierten Kompetenzgene aufgeführt. Die Spalten drei bis acht dieser Tabelle zeigen die Veränderungen der Transkription, wenn das Cia-System fehlt (KP1-Mutante). Ein Vergleich der Transkription zu der aktivierenden $CiaH_{C306}$ T230P-Mutation ist in den Spalten zehn bis elf dargestellt (KP3-Mutante). In der Spalte neun ist der Vergleich der KP1- mit der KP3-Mutante wiedergegeben.

**Tabelle 3.16: Cia-abhängig transkribierte Kompetenzgene**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0013* | | | | | | | | | | |
| *spr1819* | *comX* | 0,46 | 0,98 | 1,93 | 4,82 | 2,84 | **0,10** | 1,32 | 1,10 | 0,62 |
| *spr0020* | hypoth. | 0,74 | 1,12 | 1,78 | 2,33 | 3,48 | **0,08** | 1,02 | **1,06** | 0,93 |
| *spr0030* | hypoth. | 1,12 | 1,27 | 1,33 | 2,32 | 2,28 | **0,12** | **1,58** | 1,11 | 0,61 |
| *spr0043* | *comA* | 0,53 | 0,87 | 2,32 | 5,26 | 4,61 | **0,09** | 1,35 | 1,18 | 1,38 |
| *spr0127* | orf51 | 0,76 | 0,87 | 1,30 | 3,97 | 5,92 | **0,07** | 1,89 | **2,14** | 0,53 |
| *spr0128* | hypoth. | 1,01 | 1,04 | 1,68 | 1,84 | 5,70 | **0,07** | **2,27** | **2,11** | 0,50 |
| *spr0181* | orf47 | 0,86 | 1,29 | 1,44 | 1,80 | 1,16 | **0,46** | 1,36 | 0,97 | 0,90 |
| *spr0453* | *hrcA* | 0,68 | **0,40** | 1,07 | 1,69 | **1,86** | 0,80 | 1,25 | 0,71 | 1,13 |
| *spr0454* | *grpE* | 0,60 | **0,47** | 1,05 | 1,47 | 1,40 | 1,12 | 1,11 | **0,68** | 0,92 |
| *spr0469* | hypoth. | 0,66 | 1,06 | 1,75 | 1,60 | 1,74 | **0,38** | 2,26 | 1,08 | 0,55 |
| *spr0472* | *blpY* | 0,45 | 0,78 | 1,11 | 1,13 | 1,50 | **0,04** | **6,42** | 1,07 | **0,29** |
| *spr0473* | *blpZ* | 0,56 | 0,81 | 1,14 | 1,60 | 1,65 | **0,10** | **5,43** | 1,02 | **0,32** |
| *spr0474* | *pncP* | 0,36 | 0,65 | 1,10 | 1,70 | 1,64 | **0,04** | **5,99** | 0,97 | **0,24** |
| *spr0856* | *celA* | 0,84 | 0,97 | 2,53 | 7,04 | 6,50 | **0,07** | 1,66 | 1,93 | 0,57 |
| *spr0857* | *celB* | 0,87 | 1,09 | 1,73 | 2,73 | 3,14 | **0,05** | 2,05 | 1,05 | 0,66 |
| *spr0858* | hypoth. | 0,97 | 1,32 | 1,41 | 1,14 | 0,84 | **0,15** | 1,55 | **1,41** | **0,53** |
| *spr0859* | hypoth. | 1,14 | 1,08 | 1,28 | 1,16 | 0,89 | **0,18** | 1,65 | **1,18** | 0,51 |
| *spr0860* | hypoth. | 1,15 | 1,02 | 1,13 | 1,05 | 0,94 | **0,40** | 1,02 | 0,98 | 0,67 |
| *spr0881* | *coiA* | 1,08 | 1,40 | 2,41 | 5,56 | 4,95 | **0,09** | 1,70 | 1,21 | 0,75 |
| *spr0884* | *ppmA* | 2,19 | **2,34** | 1,76 | **1,53** | 1,60 | 1,34 | 0,58 | **0,36** | 2,30 |
| *spr0996* | *radC* | | 1,37 | 2,30 | 4,16 | 1,14 | **0,22** | 2,00 | 1,02 | 0,40 |
| *spr1144* | *smf* | **0,76** | 1,10 | 1,91 | 0,97 | 3,14 | **0,05** | **2,40** | 1,30 | **0,34** |
| *spr1628* | *pilD* | 0,89 | 0,90 | 1,78 | 3,70 | | **0,31** | 0,89 | 1,01 | 0,98 |
| *spr1724* | *ssbB* | 0,67 | 1,06 | 1,66 | 0,89 | 5,64 | **0,09** | **1,87** | **1,47** | 0,59 |
| *spr1754* | *lytA* | 0,92 | 1,05 | 1,18 | 1,47 | 1,14 | **0,42** | 0,97 | 0,93 | 0,91 |
| *spr1756* | *dinF* | **0,99** | 1,30 | 1,50 | 1,74 | 1,41 | **0,37** | 1,19 | **0,90** | 0,83 |
| *spr1757* | *recA* | 1,09 | 1,26 | 1,57 | 1,34 | 1,17 | **0,36** | 1,10 | **0,82** | 0,97 |
| *spr1758* | *cinA* | 0,79 | 1,04 | 1,35 | 2,55 | 2,23 | **0,17** | 1,39 | 1,04 | 0,84 |
| *spr1762* | hypoth. | 0,59 | 1,22 | 1,60 | 1,05 | 0,84 | **0,38** | 1,20 | 0,76 | 1,28 |
| *spr1826* | hypoth. | 0,90 | 0,81 | 0,92 | 1,26 | 1,16 | **0,49** | 1,17 | **0,67** | 0,91 |
| *spr1831* | hypoth. | 0,98 | 1,05 | 1,33 | 1,79 | 1,53 | **0,19** | 2,32 | 1,18 | 0,87 |
| *spr1856* | hypoth. | 0,81 | 1,43 | 2,54 | 2,26 | 2,12 | **0,07** | 1,25 | 1,38 | 0,88 |
| *spr1857* | hypoth. | 0,91 | 1,48 | 2,37 | 3,28 | 3,42 | **0,09** | 1,62 | 1,19 | 0,75 |
| *spr1858* | hypoth. | 1,05 | 1,11 | 1,96 | 3,81 | 3,97 | **0,07** | 1,16 | **1,58** | 0,96 |
| *spr1859* | hypoth. | 0,91 | 1,02 | 1,68 | 4,82 | 5,07 | **0,07** | 1,11 | **1,47** | 0,79 |
| *spr1861* | *cglD* | 1,02 | 1,21 | 2,18 | 2,53 | 2,87 | **0,06** | 1,29 | **1,52** | 0,93 |
| *spr1862* | *cglC* | 1,02 | 0,98 | 1,85 | 3,71 | 3,04 | **0,07** | 1,35 | **1,30** | 0,88 |
| *spr1863* | *cglB* | 0,85 | 1,30 | 2,76 | 4,53 | 5,28 | **0,08** | 1,68 | **1,62** | 1,03 |
| *spr1864* | *cglA* | 1,02 | 1,24 | 2,19 | 4,69 | 4,57 | **0,06** | 1,59 | 1,50 | 0,79 |
| *spr2003* | hypoth. | 1,27 | 1,54 | **1,52** | 1,13 | 0,90 | 0,92 | 1,03 | **2,07** | 1,02 |
| *spr2006* | *cbpD* | 0,82 | 1,41 | 2,33 | 5,35 | 4,79 | **0,06** | 1,55 | 1,16 | **0,58** |
| *spr2012* | *comFC* | 0,98 | 1,45 | 2,56 | 6,72 | 4,78 | **0,05** | 1,88 | 1,28 | 0,69 |
| *spr2013* | *comFA* | 0,61 | 1,32 | 2,47 | 3,18 | 4,99 | **0,09** | **1,58** | 0,95 | 0,69 |
| *spr2041* | *comE* | 0,74 | 1,14 | 2,56 | 2,51 | 1,24 | **0,10** | 1,23 | 1,53 | 0,74 |
| *spr2042* | *comD* | 0,60 | 0,90 | 1,77 | 5,04 | 2,57 | **0,04** | 1,53 | 1,14 | 0,61 |
| *spr2043* | *comC* | 0,52 | 0,84 | 2,15 | 3,91 | 2,26 | **0,03** | 1,12 | 0,84 | 0,71 |

Dargestellt sind die Kompetenzgene, welche in globalen Transkriptionsanalysen mit Cia-Mutanten in mindestens einer Bedingung signifikant 2-fach unterschiedlich transkribiert wurden. **Fett** gedruckte Werte sind statistisch signifikant (FDR < 1%). Zur besseren Übersicht sind Werte von < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün), von > 1,4 rot (> 2 dunkelrot) und zwischen 0,7 – 1,4 weiß unterlegt. KP1 ist die Cia „OFF"- und KP3 die Cia „ON"-Mutante. Die Verhältnisse sind jeweils so dargestellt, dass die Werte von der Mutante durch die Werte von dem Wildtyp R6 dividiert wurden. Für das KP3 – KP1-Ratio wurden die Werte von KP3 durch die Werte von KP1 geteilt.

Die in Tabelle 3.16 aufgelisteten Daten lassen einen großen Einfluss des Mediums auf die Transkription der Kompetenzgene erkennen. Der Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp war in THB-Medium deutlicher als in CpH8-Medium. In Kapitel 3.7.1 wurde

gezeigt, dass die Transkription der Kompetenzgene im Wildtyp R6 ca. 30-fach höher in CpH8-Medium als in THB-Medium war, so dass die in Tab. 3.16 vorgestellten Unterschiede zur KP1-Mutante (Cia „OFF“) fast ausschließlich auf die Unterschiede im Wildtyp zurückzuführen sein könnten. Nur sehr geringe Transkriptionsunterschiede waren zwischen dem Wildtyp und der KP3-Mutante (Cia „ON“) vorhanden.
Diese Daten demonstrieren, dass die großen phänotypischen Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen nicht mit der Transkriptionsstärke der Kompetenzgene korrelieren. Dabei muss beachtet werden, dass diese geringe Korrelation auch durch die Abwesenheit des BSA hervorgerufen sein kann.

**Cia-abhängige Transkription von Genen, die nicht zum Cia- oder Kompetenz-Regulon gehören**

Überraschenderweise wurden neben den erwarteten Kompetenzgenen und den Genen des Cia-Regulons weitere Gene Cia-abhängig transkribiert. Von den insgesamt 158 Cia-abhängig transkribierten Genen gehören 85 (53%) nicht zum Kompetenz- oder Cia-Regulon. Diese 85 Gene wurden in vier Gruppen eingeteilt, da ihre Produkte an folgenden Funktionen beteiligt sind: Zuckermetabolismus, Stickstoffmetabolismus, Transport und ohne Gruppenzugehörigkeit (Diverse). Eine Cia-abhängige Transkription wurde dann angenommen, wenn ein Gen zu einer untersuchten Bedingung signifikant mehr als 2-fach unterschiedlich transkribiert wurde. Viele dieser 85 nicht zum Kompetenz- oder Cia-Rgulon gehörenden Gene hatten als maximalen Transkriptionsunterschied in den meisten untersuchten Bedingungen Werte zwischen 2 und 3. Wenn ein anderer Schwellenwert angelegt wird, reduziert sich die Anzahl an regulierten Genen. Bei einem Schwellenwert von 2,5 anstelle von 2 wurden statt 85 Gene nur noch 73 Gene selektiert, bei einem Schwellenwert von 3 nur noch 47 Gene. Dafür wurden bei einem Schwellenwert von 3 aber auch 7 Gene des minimalen Cia-Regulon nicht mehr detektiert. Daraus lässt sich erkennen, dass diese neuen, nicht erwarteten Gene z.T. stark reguliert waren und nicht durch Veränderung des Schwellenwertes entfernt werden können.
In den folgenden Abschnitten werden diese 4 Gruppen näher vorgestellt. Dabei wird verstärkt auf die Gene eingegangen, die eine klare Cia-abhängige Transkription aufwiesen. Für die anderen Gene kann diese Regulation nicht ausgeschlossen werden, war aber unter den hier untersuchten Bedingungen nicht unbedingt erkennbar.

Die Gruppe der Gene, deren Produkte Zucker metabolisieren, umfasst 26 Gene und ist in 4 Operons und 6 Einzelgene organisiert (siehe Tab. 3.17). Elf der Genprodukte sind am Transport der Zuckermoleküle, sieben am Metabolismus und fünf an der Regulation beteiligt. Drei Gene sind ohne bekannte Funktion (Tab. 3.17).

**Tab. 3.17: Die 26 Cia-regulierten Zuckerverwertungsgene**

| Gennummer | Genname | Mögliche Funktion | Gruppierung |
|---|---|---|---|
| *spr0276* | *bglA* | 6-Phospho-beta-Glucosidase | Stoffwechsel |
| *spr0277* | Hypoth. | hypothetisches Protein | |
| *spr0278* | PTS-EII | PTS IIB, Cellobiose-Unterfamilie | Transport |
| *spr0279* | *bglG* | Transkriptionsantiterminator BglG Familie | Regulation |
| *spr0280* | PTS-EII | PTS IIA, Cellobiose-Unterfamilie | Transport |
| *spr0281* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |
| *spr0282* | PTS-EII | PTS IIC, Cellobiose-Unterfamilie | Transport |
| *spr0291* | PTS-EII | PTS IIA, Mannose/Fructose/Sorbose Unterfamilie | Transport |
| *spr0358* | *mtlF* | PTS IIA, Fructose-Unterfamilie | Transport |
| *spr0504* | *licT* | Transcriptionalsantiterminator (BglG Familie) | Regulation |
| *spr0505* | PTS-EII | PTS IIABC, Glukose-Unterfamilie | Transport |
| *spr0506* | *bglH* | 6-Phospho-beta-Glucosidase | Stoffwechsel |
| *spr0564* | PTS-EII | PTS IIC, Galaktitol-spezifisch | Transport |
| *spr0778* | *fruR* | Transkriptionsrepressor des Fructoseoperons | Regulation |
| *spr1067* | *lacR* | Lactose PTS-Repressor | Regulation |
| *spr1069* | *lacG* | Phospho-beta-D-Galactosidase | Stoffwechsel |
| *spr1070* | *lacE* | PTS IIBC, Laktose/Cellobiose-Unterfamilie | Transport |
| *spr1071* | *lacF* | PTS IIA, Laktose/Cellobiose-Unterfamilie | Transport |
| *spr1072* | *lacT* | Antiterminatorprotein | Regulation |
| *spr1074* | *lacC* | Tagatose-6-Phosphate Kinase | Stoffwechsel |
| *spr1566* | *scrA* | PTS IIBC, Sukrose-Unterfamilie | Transport |
| *spr1668* | *galK* | Galactokinase | Stoffwechsel |
| *spr1987* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |
| *spr1988* | *glpF* | Glycerol Aufnahmeprotein | Transport |
| *spr1989* | glpD-trunc. | Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, verkürzt | Stoffwechsel |
| *spr1990* | glpD-trunc. | Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, verkürzt | Stoffwechsel |

Diese Gruppe umfasst 26 Cia-abhängig transkribierte Gene, deren Genprodukte metabolische Funktionen bei der Zuckerverwertung wahrnehmen. Sie wurden anhand ihrer Funktion eingehender gruppiert in Genprodukte, die an Transport, Regulation oder Stoffwechsel beteiligt sind (Spalte vier).

Die Cia-Abhängigkeit der Transkription dieser 26 Gene aus Tab. 3.17 ist in Tab. 3.18 veranschaulicht. Nur bei den Genen *spr0276 – spr0282* war ein eindeutiger Cia „ON"- bzw. Cia „OFF"-Effekt vorhanden. Bei allen anderen Genen war – sofern überhaupt bestehend – der Cia-Effekt wahrscheinlich durch andere Effekte überlagert, da die Gene nicht dem Aktivierungszustand des Cia-Systems entsprechend transkribiert wurden und kein Unterschied im Vergleich zu der KP1- (Cia „OFF") oder KP3-Mutante (Cia „ON") zu erkennen war. Es waren Unterschiede zwischen CpH8- und THB-Medium vorhanden. Die Gene *spr0276 – spr0282* wurden in CpH8-Medium anders reguliert als die übrigen Zuckerverwertungsgene. Während die Gene *spr0276 – spr0282* in der KP1-Mutante eine geringere Transkription als im Wildtyp aufwiesen, verhielten sich die anderen Gene in CpH8-Medium konträr dazu.
Unter Berücksichtigung von starken Transkriptionsunterschieden (Ratio > 3) bleiben lediglich Gene der drei Operons *spr0276 – spr0282*, des *lac*-Operons und des *spr1987 – spr1990*-Operons übrig.

**Tab. 3.18: Cia-abhängige Transkription von Genen der Gruppe „Zuckermetabilismus“**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0276* | *bglA* | 0,37 | 0,42 | **0,22** | 0,22 | 0,22 | **0,26** | **0,04** | **10,00** | **2,00** |
| *spr0277* | hypoth. | 0,45 | 0,38 | **0,21** | 0,18 | 0,18 | **0,50** | **0,05** | **5,00** | **1,67** |
| *spr0278* | PTS-EII | 0,48 | 0,34 | 0,38 | 0,36 | 0,33 | **0,53** | **0,20** | **3,33** | **0,67** |
| *spr0279* | *bglG* | **0,50** | **0,42** | 0,32 | **0,20** | **0,24** | **0,43** | **0,09** | **5,00** | **1,67** |
| *spr0280* | PTS-EII | **0,40** | 0,50 | **0,36** | 0,33 | 0,31 | **0,59** | **0,11** | **5,00** | **1,43** |
| *spr0281* | hypoth. | 0,43 | 0,34 | 0,37 | 0,22 | 0,31 | **0,45** | **0,08** | **5,00** | **1,67** |
| *spr0282* | PTS-EII | 0,43 | 0,42 | 0,30 | 0,24 | 0,32 | **0,45** | **0,06** | **3,33** | **1,67** |
| *spr0291* | PTS-EII | 1,11 | 1,43 | 1,25 | 1,25 | 1,11 | **2,50** | 1,43 | 0,83 | 0,83 |
| *spr0358* | *mtlF* | | | | | | **0,42** | 0,63 | 2,00 | |
| *spr0504* | *licT* | 1,43 | 2,00 | 2,00 | 2,50 | 1,43 | **0,59** | 2,00 | 0,71 | **2,00** |
| *spr0505* | PTS-EII | 1,43 | 2,50 | 1,25 | 1,43 | 2,00 | **0,43** | 1,43 | 0,83 | **1,67** |
| *spr0506* | *bglH* | 1,00 | 2,00 | 1,25 | 1,43 | 1,25 | **0,67** | **2,00** | 0,91 | **1,67** |
| *spr0564* | PTS-EII | 0,91 | 1,25 | 1,11 | 0,63 | 0,63 | **0,45** | 1,00 | 1,00 | 0,91 |
| *spr0778* | *fruR* | 0,91 | 0,83 | 0,77 | 1,00 | 1,43 | **0,48** | 1,43 | 0,53 | 1,00 |
| *spr1067* | *lacR* | 0,91 | 1,11 | 1,00 | 0,83 | 0,91 | **0,43** | 0,91 | 0,91 | 0,91 |
| *spr1069* | *lacG* | 0,91 | 1,67 | 2,00 | 1,43 | 1,25 | **0,21** | 1,43 | 1,00 | |
| *spr1070* | *lacE* | 1,00 | 2,50 | **2,00** | 1,43 | | **0,28** | **2,00** | 0,71 | 0,91 |
| *spr1071* | *lacF* | 1,43 | 2,00 | 1,67 | 1,25 | 1,00 | **0,25** | 2,50 | 0,71 | 0,83 |
| *spr1072* | *lacT* | 1,11 | 2,00 | 1,67 | 1,25 | | **0,24** | **1,67** | 0,83 | 0,67 |
| *spr1074* | *lacC* | 1,00 | 1,25 | 1,00 | 0,91 | 0,77 | **0,19** | 1,00 | 0,83 | 1,25 |
| *spr1566* | *scrA* | 2,50 | 1,00 | 1,25 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 1,25 | 1,00 |
| *spr1668* | *galK* | 1,00 | 1,00 | 0,91 | 1,00 | 1,25 | **0,34** | 1,25 | 0,71 | 1,00 |
| *spr1987* | hypoth. | 2,00 | 2,00 | **2,50** | 1,67 | 1,67 | 0,77 | 0,83 | 2,00 | **2,00** |
| *spr1988* | *glpF* | 2,50 | 5,00 | **3,33** | 3,33 | 3,33 | 0,77 | 0,53 | 1,67 | **2,00** |
| *spr1989* | *glpD* | 1,11 | 1,43 | **3,33** | 1,25 | 1,67 | 1,11 | 1,11 | 0,91 | 1,11 |
| *spr1990* | *glpD* | 2,00 | 2,50 | **2,50** | 2,00 | 2,50 | 1,00 | 0,77 | **1,43** | **1,43** |

Dargestellt sind Ergebnisse von globalen Transkriptionsanalysen. Es sind die Daten der Gene aus Tabelle 3.17 gezeigt. Die Gruppierung dieser Gene richtete sich nach den metabolischen Funktionen der Genprodukte. Alle Genprodukte sind an der Verstoffwechslung von Zucker beteiligt. Verglichen wurde das Transkriptom des R6-Wildtyps gegen die KP1-Mutante in CpH8-Medium (Spalten 3 bis 7) und in THB-Medium (Spalte 8) sowie gegen die KP3-Mutante in CpH8-Medium (Spalte 10) und in THB-Medium (Spalte 11). Die KP1-Mutante wurde auch direkt mit der KP3-Mutante verglichen (Spalte 9). Zur besseren Übersicht sind Änderungen von > 1,4 rot (> 2 dunkelrot), von < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) und zwischen 0,7 und 1,4 weiß markiert. Die Verhältnisse sind jeweils so dargestellt, dass die Werte der Mutante durch die Werte des Wildtyps R6 dividiert wurden. Das KP3 – KP1-Verhältnis wurde als Wert von KP3 geteilt durch Wert von KP1 errechnet. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant. Ein freies Feld bedeutet, dass in dem entsprechenden Experiment die Qualtität der erzielten Daten zu gering war (siehe Kapitel 2.19).

Die 16 Gene umfassende Gruppe der ABC-Transporter ist geprägt durch drei Operons (*spr1289 – spr1293*, *spr1379 – spr1382*, *spr1546 – spr1549*) und vier Einzelgene (siehe Tabelle 3.19). Es wurden auch die Gene in diese Gruppe aufgenommen, deren hypothetische Genprodukte in einem Operon mit Genen für ABC-Transporter transkribiert werden *(spr1291*, *spr1292*, *spr1547 – spr1549*).

**Tab. 3.19: Die 16 Mitglieder umfassende Gruppe der ABC-Transporter**

| Gennummer | Genname | Mögliche Funktion | Klassifikation |
|---|---|---|---|
| *spr0081* | ABC-MSP | ABC Transporter Membranepermease - Zuckertransport | 3.A.1.1 |
| *spr0101* | ABC-SBP | ABC Transporter lösliches Bindeprotein - Aminosäuretransport | 3.A.1.3 |
| *spr0641* | *ctpA* | P-typ ATPase – möglicher Kupfertransporter | 3.A.3.5 |
| *spr1191* | *appD* | ABC Transporter ATP-Bindeprotein - Oligopeptidetransport | 3.A.1.5 |
| *spr1289* | ABC-N/P | ABC Transporter ATP-Binde-/Membran-Protein – unbekanntes Substrate | 3.A.1.210 |
| *spr1290* | ABC-N/P | ABC Transporter ATP-Binde-/Membran-Protein – unbekanntes Substrate | 3.A.1.210 |
| *spr1291* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |
| *spr1292* | hypoth. | konserviertes hypothetisches Protein | |
| *spr1293* | ABC-NBD | ABC Transporter ATP-Bindeprotein – unbekanntes Substrate | 3.A.1.2 |
| *spr1379* | ABC-MSP-trunc. | ABC Transporter, verkürzt | 3.A.1.117/123 |
| *spr1381* | ABC-MSP-trunc. | ABC Transporter, verkürzt | 3.A.1.123 |
| *spr1382* | *aliB* | ABC Transporter Substrate Bindeprotein - Oligopeptidetransport | 3.A.1.5 |
| *spr1546* | ABC-NBD | ABC Transporter ATP-Bindeprotein – unbekanntes Substrate | Nicht klassifizier-bar |
| *spr1547* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |
| *spr1548* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |
| *spr1549* | hypoth. | Hypothetisches Protein | |

Diese Gruppe umfasst 16 Cia-abhängig transkribierte Gene, deren Genprodukte Transportfunktionen haben oder ohne bekannte Funktion sind, aber mit ABC-Transportern in einem Operon transkribiert werden. In der vierten Spalte ist die Klassifizierung der Gene nach dem TC-System angegeben.

Die Transporter werden nach einem TC-System klassifiziert (Busch und Saier, 2002), welches ähnlich dem EC-System für Ezyme aufgebaut ist. Die Klassifikation der Gene aus Tabelle 3.19 innerhalb dieses TC-Systems ist in der letzten Spalte angegeben. Die ABC-Transporter bilden die ATP-Bindekassette-Superfamilie (3.A.1). In Bakterien besteht die Mehrzahl der ABC-Transporter aus einem Substrat-Bindeprotein, zwei Membran-integrierten Komponenten und zwei Membran-assoziierten ATP-Bindekassetten. Das Substrat-Bindeprotein ist außerhalb des Cytoplasmas und in Gram-positiven entweder ein Lipoprotein oder ein anders assoziiertes Zelloberflächenprotein. Die hier aufgeführten Familien der 3.A.1-Superfamilie transportieren Zucker (3.A.1.1 und 3.A.1.2), polare Aminosäuren (3.A.1.3) und Peptide (3.A.1.5). Die drei anderen Familien dieser Superfamilie enthalten Exporter für Antibiotika (3.A.1.117/120) sowie Peptide (3.A.1.123). Es fällt auf, dass CtpA nicht in diese Superfamilie gehört, sondern in die P-Typ ATPase Superfamilie (3.A.3). Diese führen in der Regel einen ATP-getriebenen Antiport durch. Innerhalb dieser Superfamilie bilden die Kupfertransporter eine eigene Familie (3.A.3.5), von denen einige auch Silberionen transportieren können.
Die Transkriptionsverhältnisse der Gene aus Tabelle 3.19 sind in der Tabelle 3.20 aufgelistet. Unter diesen Genen sind nur die *spr1191* und *spr1289 – spr1293*-Gene, bei denen eine Transkriptionsabhängigkeit vom Aktivierungszustand des Cia-Systems erkannt werden kann. Jedoch ist dieser nicht so eindeutig wie bei den Genen des minimalen Cia-Regulons.
Die Transkriptionsunterschiede sind bei 10 der 16 Gene zu einer der untersuchten Bedingung größer als 3, so dass anscheinend die Transkription dieser Gene z.T. starken Cia-abhängigen Schwankungen unterliegt.

**Tab. 3.20: Cia-abhängige Transkription von Genen der Gruppe „Transport“**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0081* | ABC-MSP | 0,50 | 1,00 | 0,67 | 0,91 | 0,83 | **0,33** | 0,83 | 0,32 | **0,38** |
| *spr0101* | ABC-SBP | 1,25 | 1,67 | **2,50** | 2,50 | 1,43 | **2,00** | **2,50** | 1,67 | 0,91 |
| *spr0641* | *ctpA* | **5,00** | 3,33 | 1,43 | 0,59 | 0,63 | 1,11 | 1,25 | 0,77 | 0,91 |
| *spr1191* | *appD* | 2,00 | 3,33 | 3,33 | 2,50 | **5,00** | 1,00 | 0,71 | 0,63 | 1,00 |
| *spr1289* | ABC-N/P | 2,00 | 2,00 | 3,33 | 5,00 | **5,00** | **3,33** | 2,50 | 0,38 | 0,91 |
| *spr1290* | ABC-N/P | 1,25 | 1,25 | 2,00 | 1,43 | 1,43 | **2,00** | 1,67 | 0,77 | 0,83 |
| *spr1291* | hypoth. | | | 3,33 | | | **2,50** | **2,50** | 0,56 | 0,83 |
| *spr1292* | hypoth. | 2,50 | 2,50 | **3,33** | 1,11 | 0,91 | **5,00** | **3,33** | 0,48 | 0,83 |
| *spr1293* | ABC-NBD | 1,25 | 1,43 | **3,33** | 2,50 | 1,25 | **2,00** | 2,00 | 0,59 | 1,25 |
| *spr1379* | ABC-MSP- | 0,91 | 0,83 | 0,91 | 1,11 | 1,00 | **2,50** | 1,67 | 0,77 | 0,71 |
| *spr1381* | ABC-MSP- | 0,91 | 1,00 | 0,83 | 1,11 | 0,91 | **2,50** | 1,67 | 1,00 | 0,83 |
| *spr1382* | *aliB* | 0,77 | 0,83 | 0,91 | 1,25 | 1,43 | **2,00** | 1,43 | 0,83 | 0,77 |
| *spr1546* | ABC-NBD | 0,56 | 0,77 | 0,83 | 1,00 | 0,77 | 0,91 | 0,83 | **0,36** | 0,83 |
| *spr1547* | hypoth. | 0,50 | 0,56 | 0,38 | 0,53 | 0,77 | 0,77 | 0,71 | **0,25** | 1,11 |
| *spr1548* | hypoth. | 0,48 | 0,59 | 0,33 | 0,36 | 0,48 | 0,83 | 0,71 | **0,23** | 0,91 |
| *spr1549* | hypoth. | 0,48 | 0,59 | 0,34 | 0,63 | 1,11 | 0,77 | 0,67 | **0,24** | 0,77 |

Dargestellt sind Ergebnisse von globalen Transkriptionsanalysen. Die Gruppierung dieser Gene orientierte sich an der Charakterisierung der Proteine als Transporter. Verglichen wurde das Transkriptom des R6-Wildtyps gegen die KP1-Mutante in CpH8-Medium (Spalten 3 bis 7) und in THB-Medium (Spalte 8) sowie gegen die KP3-Mutante in CpH8-Medium (Spalte 10) und in THB-Medium (Spalte 11). Die KP1-Mutante wurde auch gegen die KP3-Mutante verglichen (Spalte 9). Zur besseren Übersicht sind Änderungen von mehr als 1,4 rot (> 2 dunkelrot), von weniger als 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) unterlegt. Die Verhältnisse sind jeweils so dargestellt, dass die Werte der Mutante durch die Werte des Wildtyps R6 dividiert wurden. Das KP3 – KP1-Verhältnis wurde so berechnet, dass die Werte von KP1 im Nenner sind. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant (FDR < 1%).

Die dritte funktionelle Gruppe umfasst 14 Gene, deren Genprodukte am Stickstoff-Metabolismus beteiligt sind. Es wurden Gene des Purin- und Pyrimidin-Operons, der Glutaminsynthetase und der NAD-Biosynthese nachgewiesen (siehe Tabelle 3.21). Zwei Gene ohne bekannte Produktfunktion (*spr0615* und *spr0617*) wurden aufgrund ihrer Transkription im Operon mit *spr0613* und *spr0614* in diese Gruppe eingeteilt. Insgesamt besteht diese Gruppe aus 3 Operons und 4 Einzelgenen.

**Tab. 3.21: Cia-abhängig transkribierte Gene, deren Genprodukte am Stickstoff-Metabolismus beteiligt sind**

| Gennummer | Genname | Mögliche Funktion |
|---|---|---|
| *spr0049* | *purN* | 5-Phosphoribosylglycinamide TransformylaseN 1 |
| *spr0161* | *ribE* | Riboflavin Synthase beta Kette |
| *spr0443* | *glnR* | Transkriptioneller Repressor des Glutamine Synthetase Genes |
| *spr0444* | *glnA* | Glutamine Synthetase Typ 1 |
| *spr0613* | *pyrF* | Orotidine-5-Decarboxylase |
| *spr0614* | *pyrE* | Orotate Phosphoribosyltransferase |
| *spr0615* | hypoth. | Hypothetisches Protein |
| *spr0617* | hypoth. | Hypothetisches Protein |
| *spr0866* | *pyrD* | Dihydroorotate Dehydrogenase |
| *spr1153* | *carB* | Carbamoylphosphat Synthase (Ammonium), schwere Untereinheit |
| *spr1154* | *carA* | Carbamoylphosphat Synthase (Glutamine-hydrolysierend) leichte Untereinheit |
| *spr1155* | *pyrB* | Aspartat Carbamoyltransferase |
| *spr1156* | *pyrR* | Transkriptioneller Attenuator des Pyrimidinoperon / Uracil Phosphoribosyltransferase Aktivität |
| *spr1829* | *nadC* | mögliche Nicotinat-Nucleotid Pyrophosphorylase |

Diese Gruppe umfasst 14 Cia-abhängig transkribierte Gene, deren Genprodukte am Stickstoff-Metabolismus beteiligt sind.

Die Transkriptionsverhältnisse dieser Gene sind in Tabelle 3.22 wiedergegeben. Ihre Cia-abhängige Transkription war maßgeblich durch das Medium (CpH8- oder THB-) und weniger durch den Aktivierungszustand des Cia-Systems beeinflusst. Besonders deutlich wird dies in den Spalten 10 und 11, in denen zehn Gene eine unterschiedliche Transkription in THB-Medium, jedoch nicht in CpH8 zeigten.
Nur drei Gene wiesen zu einer untersuchten Bedingung Transkriptionsunterschiede > 3 auf, so dass die Gene dieser Gruppe wahrscheinlich nicht Cia-abhängig, sondern aufgrund von sekundären Effekten transkribiert wurden.

**Tab. 3.22: Cia-abhängige Transkription von Genen der Gruppe „Stickstoff-Metabolismus“**

| | | KP1 ($Cia^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 ($Cia^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0049* | *purN* | 1,25 | 1,00 | 0,71 | 0,83 | 1,00 | **2,00** | 1,11 | 0,67 | 1,25 |
| *spr0161* | *ribE* | **0,50** | 0,42 | 0,63 | 0,83 | 1,11 | 1,00 | 0,63 | 0,91 | 0,63 |
| *spr0443* | *glnR* | 1,67 | 0,77 | 0,53 | 0,77 | 1,11 | **0,36** | 1,25 | 0,63 | 0,83 |
| *spr0444* | *glnA* | 1,67 | 1,11 | 0,33 | 0,56 | 0,53 | **0,34** | 1,25 | 0,71 | 0,91 |
| *spr0613* | *pyrF* | 1,67 | 1,67 | 0,59 | 0,83 | 1,00 | 0,71 | 0,91 | 1,25 | **0,38** |
| *spr0614* | *pyrE* | 1,43 | 1,11 | 0,50 | 0,83 | 0,91 | 0,77 | 0,77 | 0,83 | **0,36** |
| *spr0615* | hypoth. | 0,83 | 0,77 | 0,91 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 0,77 | **0,40** |
| *spr0617* | hypoth. | 1,00 | 1,11 | 1,00 | 1,00 | 1,11 | 1,11 | 0,91 | 0,71 | **0,48** |
| *spr0866* | *pyrD* | **2,00** | 1,11 | 0,45 | 0,83 | 1,00 | 0,91 | 1,00 | 0,77 | **0,30** |
| *spr1153* | *carB* | 1,67 | 0,83 | 0,50 | 0,77 | 1,43 | 1,11 | 1,00 | 1,00 | **0,34** |
| *spr1154* | *carA* | 2,00 | 1,25 | 0,53 | 0,77 | 0,91 | 1,11 | 1,11 | 0,71 | **0,29** |
| *spr1155* | *pyrB* | **2,00** | 1,67 | 0,67 | 0,91 | 1,00 | **0,83** | 1,00 | **0,71** | **0,32** |
| *spr1156* | *pyrR* | 1,43 | 1,67 | 0,71 | 1,11 | 1,11 | **1,25** | 1,11 | 0,63 | **0,33** |
| *spr1829* | *nadC* | 1,11 | 1,11 | 0,91 | 0,63 | 0,67 | **2,50** | 1,00 | 0,63 | **1,43** |

Dargestellt sind Ergebnisse von globalen Transkriptionsanalysen. Verglichen wurde das Transkriptom des R6-Wildtyps gegen die KP1-Mutante in CpH8-Medium (Spalten 3 bis 7) und in THB-Medium (Spalte 8) sowie gegen die KP3-Mutante in CpH8-Medium (Spalte 10) und in THB-Medium (Spalte 11). Die KP1-Mutante wurde auch gegen die KP3-Mutante verglichen (Spalte 9). Zur besseren Übersicht sind Änderungen von > 1,4 rot (> 2 dunkelrot), von < 0,7 grün (< 0,5 dunkelgrün) und von < 1,4 - > 0,7 weiß unterlegt. Die Verhältnisse sind jeweils so dargestellt, dass die Transkription in der Mutante durch die in dem Wildtyp R6 dividiert wurde. Das KP3 – KP1-Verhältnis wurde als Transkription in KP3 geteilt durch Transkription in KP1 errechnet. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant (FDR < 1%).

Unter den nicht gruppierbaren Genen (siehe Tabelle 6.3 im Anhang) sind zwei, die von besonderer Bedeutung sind. Das Gen *spr0413* stellt eine mögliche Undecaprenol-Pyrophosphatase dar, welche durch Dephosphorylierung des Undecapronol-Pyrophosphates (UPP) das Undecaprenol als Carrier wieder zugänglich macht (Chalker *et al.*, 2000; El Ghachi *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2005). Dieses Gen scheint Cia-abhängig transkribiert zu werden. Die Transkription des *spr0413*-Gens war in der KP1-Mutante allerdings höher und in der KP3-Mutante niedriger als im Wildtyp (negative Regulation).
Das zweite interessante Gen ist *spr1874*, welches als transkriptioneller Regulator aus der MarR-Familie annotiert ist. Diese Familie findet sich in Bakterien und Archaea wieder und hat eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung von niedriger Antibiotikaresistenz (Alekshun und Levy, 1999). Der *mar*-Locus aus *E. coli* führt eine globale Stressantwort aus, bei der auch viele Gene des zentralen Metabolismus, inklusive Zuckerverwertungs- und PTS-Gene, involviert sind (Barbosa und Levy, 2000). Jedoch sind keine direkten weiteren homologen Gene zu den *marRAB*-Genen aus *E. coli* oder *S. typhimurium* in *S. pneumoniae* R6 erkennbar. Das *spr1874* Gen zeigte nur in THB-Medium eine Cia-abhängige Transkription. In CpH8-Medium war keine Änderung der Transkription im Vergleich zum Wildtyp ersichtlich. In THB-Medium war die Transkription in der KP1-Mutante 1,5-fach niedriger und in der KP3-Mutante 2,5-fach höher als im Wildtyp.
In den hier vorgestellten Experimenten wurden insgesamt 158 Gene Cia-abhängig transkribiert. Ungefähr 1/3 davon sind Kompetenzgene, für die eine Abhängigkeit der

Transkription von CiaR und CiaH schon nachgewiesen werden konnte (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003). Weitere 23 der 158 Cia-regulierten Gene wurden durch Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004) als Cia-reguliert beschrieben. Es war überraschend, dass viele weitere Gene (85 Gene) in dieser Arbeit als Cia-reguliert aufgetreten sind. Diese 85 Gene wurden z.T. stark Cia-reguliert (bis zu 10-fach). Die stärkste Cia-Abhängigkeit unter diesen Genen zeigte das *spr0276 – spr0282*-Operon.

### 3.7.3 Effekte der CiaH-Deletion auf die Transkription von Genen

Die Gene *ciaR* und *ciaH* bilden ein Operon (Giammarinaro *et al.*, 1999). Durch Intergration des pJDC9-Plasmides in das *ciaR*-Gen wird die Transkription des *ciaH*-Gens unterbrochen (Zähner *et al.*, 2002). Ob die Transkription des *ciaH*-Gens auch durch Integration der Spektinomycin-Resistenzkassette in das *ciaR*-Gen (Zähner, 1999) verhindert wird, wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Es kann allerdings von dieser Verhinderung ausgegangen werden, da erstens die Transkriptomdaten aus Kapitel 3.7.2 immer eine parallele Veränderung des *ciaR*- und des *ciaH*-Gens zeigten. Zweitens findet sich kein weiterer Promotor vor dem *ciaH*-Gen, der eine *ciaR*-unabhängige Transkription bewirken könnte. Da die *ciaRH*-Gene aber autoregulatorisch transkribiert werden (Mascher *et al.*, 2003), sollte durch Inaktivierung von *ciaR* keine Transkription der *ciaRH*-Gene stattfinden. Drittens ist am 3'-Ende der Spektinomycin-Resistenzkassette ein rho-unabhängiger Terminator (LeBlanc *et al.*, 1991). Da zwischen Terminator und 5'-Ende des *ciaH*-Gens kein weiterer Promotor liegt, ist eine Transkription des *ciaH*-Gens nicht möglich. Viertens sind die *ciaRH*-Gene translational gekoppelt (die Gene überlappen um acht Basenpaare). Wenn die Translation von CiaR unterbrochen ist, wird CiaH wahrscheinlich deutlich weniger translatiert, weil sich vor dem *ciaH*-Gen keine Ribosomenbindestelle befindet.
Die KP2-Mutante enthält eine Spektinomycin-Resistenzkassette in dem *ciaH*-Gen. Es ist davon auszugehen, dass in diesem Stamm noch funktionelles CiaR-Protein hergestellt wird. Durch globale Transkriptionsanalysen der KP2-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp R6 sollte der Einfluss des CiaH-Proteins auf die Regulation der Cia-abhängig transkribierten Gene untersucht werden.

Der globale Transkriptionsvergleich der KP2-Mutante (*ciaH*::*aad9*) mit dem Wildtyp R6 wurde in CpH8-Medium und bei Nephelo 40 durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 3.23 dargestellt. Bei dieser Analyse sind nur 5 Gene als signifikant unterschiedlich mit einem Ratio von > 2 oder < 0,5 gefunden worden (siehe Tabelle 3.23).

**Tab. 3.23: Signifikant unterschiedlich transkribierte Gene durch Deletion von CiaH**

| Gennummer | Ratio | Genname | Mögliche Funktion |
|---|---|---|---|
| *spr0276* | **0.47** | *bglA* | 6-Phospho-beta-Glucosidase |
| *spr0448* | **0.30** | *hsdS* | Type I site-specific Deoxyribonuclease chain S |
| *spr0504* | **2.00** | *licT* | Transkriptionaler Antiterminator (BglG Familie) |
| *spr0708* | **0.21** | *ciaH* | Histidinkinase |
| *spr2045* | **0.35** | *htrA* | Serinprotease |
| *spr0297* | 1.23 | hypoth. | Hypothetisches Protein |
| *spr0446* | 1.59 | *hsdS* | Type I Restriktionsenzym EcoKI Spezifitätsprotein (S Protein) |
| *spr0505* | 1.29 | PTS-EII | PTS Zucker-spezifische EII-Kompenente |
| *spr0782* | 0.55 | hypoth. | Hypothetisches Protein |
| *spr1917* | 0.75 | *malM* | 4-alpha-Glucanotransferase (Amylomaltase) |
| *spr1988* | 1.25 | *glpF* | Glycerol-Aufnahme-Protein |
| *spr1991* | 1.38 | *glpK* | Glycerol Kinase |
| *spr2046* | 0.50 | *spo0J/parB* | Chromosomesegregationsprotein |

Aufgelistet sind die Gene, die in einem globalen Transkriptionsvergleich zwischen dem Wildtyp R6 und der KP2-Mutante (*ciaH*::*aad9*) in CpH8-Medium bei Nephelo 40 differentiell transkribiert wurden. Das Ratio ist als Verhältnis der Transkription in KP2 (*ciaH*::*aad9*) zu der Transkription in R6 aufgetragen. Die **fett** markierten Werte entsprechen denen mit einer FDR < 1% und Ratio > 2 oder < 0,5. Unterhalb des fettgedruckten Strichs sind acht Gene, die in Kapitel 3.7.2 als CiaRH-reguliert beschrieben wurden und hier CiaH-abhängig signifikant unterschiedlich (FDR < 1%) transkribiert wurden, aber einen Unterschied von < 2 oder > 0,5 aufwiesen.

Alle Gene aus Tabelle 3.23 sind auch im Vergleich mit der KP1-Mutante (Cia „OFF") als signifikant unterschiedlich exprimiert aufgetreten. Der Transkriptionsunterschied entspricht auch in allen fünf signifikanten Fällen denen von KP1 (Cia „OFF"). Die Gene *spr0276*,

*spr0448*, *spr0708* und *spr2045* wurden sowohl in der KP1-Mutante, als auch in der KP2-Mutante (*ciaH*::*aad9*)weniger transkribiert als im Wildtyp. Das *spr0504*-Gen wurde in beiden Fällen mehr transkribiert als im Wildtyp. Die anderen unter 3.7.2 Cia-abhängig transkribierten Gene sind in dieser Analyse entweder ohne Unterschied oder mit einer nicht signifikanten Transkriptionsänderung von < 2 oder > 0,5. Die in Tabelle 3.23 nicht fett markierten Werte haben Ratios von < 2 oder > 0,5. Es ist sehr deutlich erkennbar, dass viele dieser Gene (*spr0505*, *spr0782*, *spr1917*, *spr1988* und *spr2046*) zum Cia-Regulon gehören oder unter 3.7.2 beschrieben wurden. Die Gene *spr0446* und *spr1991* sind nicht unter 3.7.2 aufgeführt, jedoch sind diese Gene Teile von Operons, von denen andere Gene Cia-abhängig transkribiert wurden, wie z. B. *spr0447*/*spr0448* zu *spr0446* und *spr1987 – spr1990* zu *spr1991*.
Diese globale Transkriptionsanalyse zeigt, dass durch die Inaktivierung von CiaH (KP2, *ciaH*::*aad9*) wesentlich weniger Gene unterschiedlich transkribiert wurden als durch die Inaktivierung von CiaR (KP1, Cia „OFF“). Bei allen Genen war aber die Veränderung der Transkription identisch mit der von KP1 (Cia „OFF“).

## 3.8 Globale Transkriptionsanalyse von Cefotaxim-spontanresistenten Labormutanten

Die Bedeutung des Cia-Systems in den C203- und C303-Mutanten wurde in Kapitel 3.2 näher untersucht, die Transkription von zwei Cia-Zielgenen in C303 in Kapitel 3.3 vorgestellt. Aus diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass PBP-Mutationen nicht neutral sind und ein funktionelles Cia-System benötigt wird, um PBP-Mutationen zu kompensieren. Weiterhin wurde eine erhöhte Transkription von zwei Cia-Zielgenen in Anwesenheit von PBP2x-Mutationen festgestellt. Aus diesen Beobachtungen stellten sich die Fragen, ob weitere Gene durch PBP-Mutationen unterschiedlich transkribiert werden und ob das Cia-System durch mehr PBP-Mutationen noch stärker aktiviert werden kann. Daher wurde jetzt die globale Transkription der einzelnen Mitglieder einer spontanresistenten Labormutantenfamilie untersucht, die sich in der Art der PBP2x-Mutationen (C203, C303 und C503) bzw. der PBP-Mutationen (PBP2a in C403) unterscheiden. Es wurde die C003-Familie ausgewählt, da die ersten drei Mitglieder dieser Familie phänotypisch gut erfasst sind. Dabei konnte ein sukzessiver Abfall der Transformationseffizienz gezeigt werden (Mascher *et al.*, 2006), welcher wahrscheinlich durch die Aktivierung des Cia-Systems ausgelöst wird. Die Mutanten der C003-Familie und ihre Mutationen sind in Tab. 3.24 wiedergegeben. Die entstandenen Mutationen sind konsekutiv. Die Stämme höherer Nummerierung haben die Mutationen der Stämme niedriger Nummerierung. Es treten Mutationen in CiaH, PBP2x und PBP2a auf.

**Tab. 3.24: Spontanresistente Labormutanten der C003-Familie**

| Stamm | Mutation |
|---|---|
| C103 | R6-Derivat: CiaH (Ala 203 Val) |
| C203 | C103-Derivat: PBP2x (Gly 597 Asp) |
| C303 | C203-Derivat: PBP2x (Thr 550 Ala) |
| C403 | C303-Derivat: frameshift in *pbp2a*, verfrühte Termination |
| C503 | C403-Derivat: PBP2x (Arg 426 Cys) |

Das Transkriptom eines jeden Stammes wurde mit der Mikroarray-Technik bei Nephelo 40 in CpH8-Medium gegen den Wildtyp R6 untersucht. Es wurden zwei unabhängige Kulturen, welche an verschiedenen Tagen in unterschiedlichen Ansätzen des CpH8-Mediums gewachsen waren, analysiert. Dabei wurde so verfahren, dass die 5 Stämme und der R6 zeitgleich in demgleichen Medium angezogen und alle Kulturen gegen den R6 verglichen wurden. Ein Gen wurde in die Liste (siehe Tabelle 6.4 im Anhang) aufgenommen, wenn es in einem Vergleich signifikant (FDR < 1%) mit einem zweifachen Transkriptionsunterschied aufgetreten war.
Insgesamt konnten so 233 Gene als differentiell transkribiert beobachtet werden. In C103 wurden 20 Gene, in C203 36, in C303 66, in C403 144 und in C503 163 Gene unterschiedlich transkribiert. Mit steigender Resistenz bzw. steigender Anzahl der Mutationen nahm die Anzahl der betroffenen Gene zu.
Die phänotypische Beobachtung der ansteigenden Kompetenzdefizienz von C103 bis C303 konnte auch auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Abb. 3.35). Die *comABCDE*-Gene (*spr0042*, *spr0043*, *spr2041 – spr2043*), welche zu den frühen Kompetenzgenen gehören, wurden in allen untersuchten Mutanten weniger transkribiert als im Wildtyp. Dabei war der Unterschied zu der C103- und der C203-Mutante mit einem Faktor von 3 eher gering. Die Transkription der frühen und späten Kompetenzgene war in C303, C403 und C503 dramatisch reduziert (bis zu 144-fach, *spr0127*), wobei es noch kleine Steigerungen von C303 zu C503 gab. Die Unterschiede zwischen C303, C403 und C503 waren jedoch sehr gering und die Schwankungen einzelner Gene überwogen z.T. die Unterschiede zwischen den Mutanten.

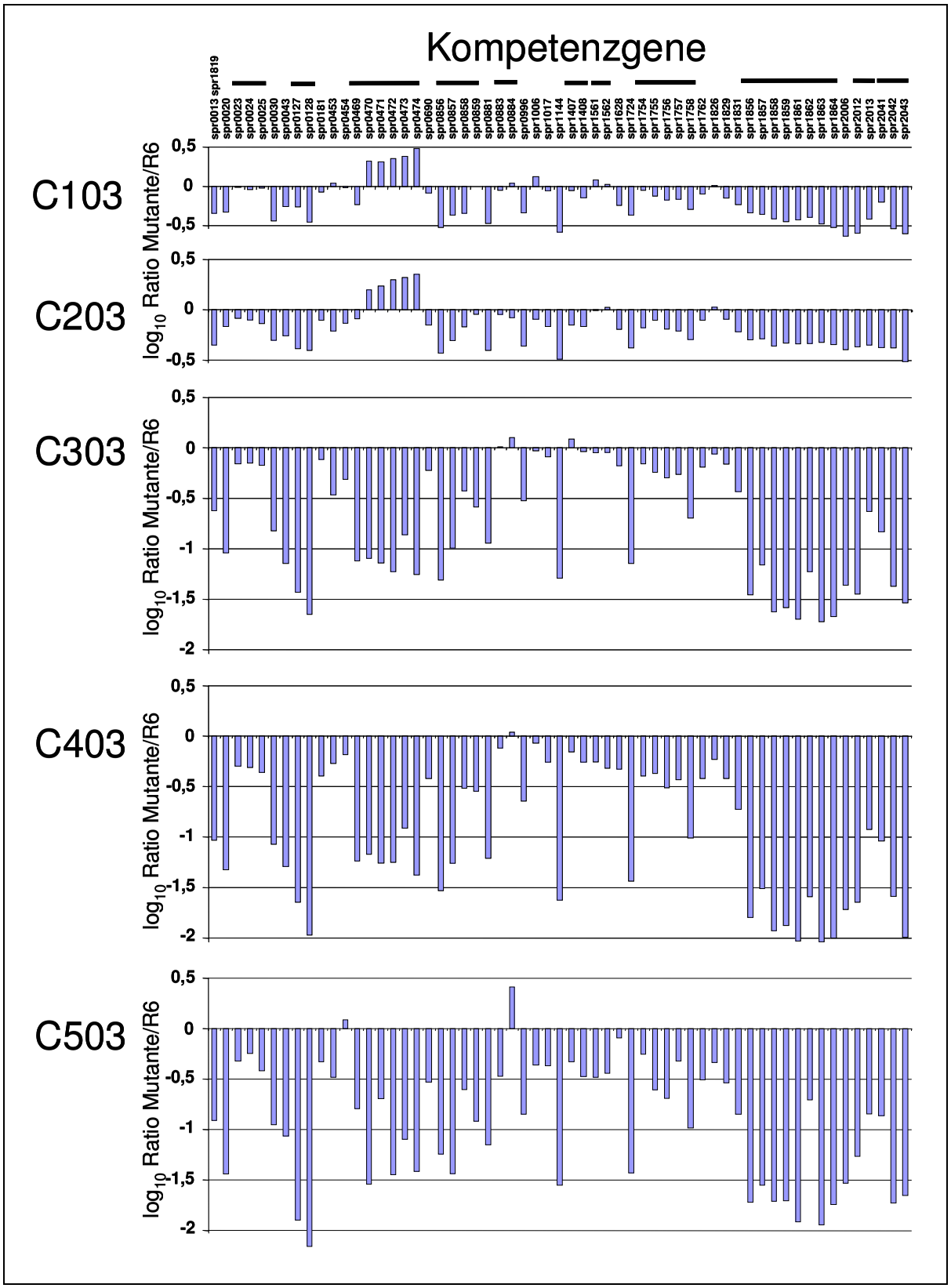



**Abb. 3.35: Transkriptionsvergleich der Gene des Kompetenz-Regulons**

Dargestellt ist der Transkriptionsunterschied der Gene des Kompetenz-Regulons (Peterson *et al.*, 2004) zwischen den C103 – C503-Mutanten zum Wildtyp R6. Die Ordinate stellt das logarithmierte Ratio als Mutante / R6 – Verhältnis dar. Die Balken über den Gennummern zeigen Transkriptionseinheiten an (Operons). Die abgebildeten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Kulturen. Jede Kultur generiert maximal 4 Werte.

Die Unterschiede der Gene, die nicht zu den frühen oder späten Kompetenzgenen gehören, waren weniger eindeutig. Die Verhältnisse zu C103 waren unterhalb eines Ratios 2 und steigerten sich bis zu einem Unterschied von 10 in C503. Zusätzlich waren auch einzelne Gene betroffen, die mit steigender Resistenz stärker transkribiert wurden (5 Gene des *blp*-Operons in C103 und C203, *spr0884* (*ppmA*) in C503). Die Transkriptions-unterschiede der anderen Kompetenzgene, deren Transkription in den Mutanten erhöht war, waren im allgemeinen Schwankungsbereich und nicht biologisch signifikant (< 2-fach).
Diese Daten zeigen, dass die Mutation in C103 (CiaH A203V) das Kompetenzregulon nur leicht (ca. 2-fach) herunterregulierte. Hiervon gab es aber auch Ausnahmen. Diese Regulation wurde nicht durch die PBP2x-Mutation aus C203 (PBP2x G597D) verstärkt. Der entscheidende Schritt zu einer starken Herrunterregulierung des Kompetenz-Regulons passierte in C303 durch die zweite PBP2x-Mutation (PBP2x T550A). Die zusätzlichen Mutationen aus C403 (PBP2a$^-$) und C503 (PBP2x R426C) führten im Wesentlichen nicht zu einer weiteren Reprimierung. Das *blp*-Operon unterlag wahrscheinlich einer weiteren Regulation, da es erst bei vollständiger Reprimierung weniger transkribiert wurde. *Spr0884* (*ppmA*) wurde vermutlich auch noch von anderen Faktoren reguliert, da es nur in C503 eine signifikante Transkriptionsänderung aufwies. Möglicherweise gehört es nicht direkt zum Kompetenzregulon, obwohl es deutlich durch CSP induziert wird (Peterson *et al.*, 2004).
Die CiaH-Mutation Ala 203 Val wurde in C103 beschrieben (Zähner *et al.*, 1996). Ob dieses CiaH-Allel das Cia-System ähnlich aktivieren kann wie das CiaH-Allel mit der Thr 230 Pro Mutation, wurde durch diesen Transkriptomvergleich analysiert. Zusätzlich kann eine Aussage über die Aktivierung durch die weiteren PBP-Mutationen aus C403 und C503 gemacht werden. In Tab. 3.25 ist der Transkriptionsunterschied des minimalen Cia-Regulons in C103 bis C503 zum Wildtyp R6 abgebildet.

**Tab. 3.25: Die Transkription des minimalen Cia-Regulons in spontanresistenten Laborstämmen**

| Gennummer | Genname | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0259* | *manN* | 0,66 | **0,53** | 0,57 | **0,39** | **0,24** |
| *spr0260* | *manM* | 0,78 | **0,52** | 0,53 | **0,43** | **0,32** |
| *spr0261* | *manL* | 0,78 | **0,43** | 0,51 | **0,39** | 0,31 |
| *spr0343* | *hk03* | 0,90 | 1,12 | **1,53** | **1,40** | 1,13 |
| *spr0344* | *rr03* | 0,95 | 1,00 | **1,62** | 1,40 | 1,03 |
| *spr0707* | *ciaR* | 1,24 | **1,39** | **1,72** | **2,69** | **6,71** |
| *spr0708* | *ciaH* | 1,07 | **1,47** | **1,53** | **2,22** | **3,24** |
| *spr0782* | hypoth. | **2,38** | **1,57** | 1,58 | **2,58** | **9,86** |
| *spr0931* | hypoth. | **2,13** | **1,44** | 1,38 | **1,91** | **4,81** |
| *spr1145* | *licC* | 1.20 | 0.91 | 1.38 | 1.19 | 1.20 |
| *spr1146* | *licB* | 1.22 | 0.94 | 1.09 | 0.92 | 1.07 |
| *spr1147* | *pck* | 1.23 | 0.83 | 1.01 | 0.85 | 0.78 |
| *spr1148* | hypoth. | **1.31** | **0.70** | 0.85 | 0.82 | **0.71** |
| *spr1149* | hypoth. | 1.34 | 0.75 | 0.76 | 0.65 | 0.82 |
| *spr1538* | *axe* | 1,19 | 1,23 | 0,97 | **1,46** | **3,41** |
| *spr1916* | *malP* | **1,76** | **1,22** | **1,58** | **2,33** | **4,45** |
| *spr1917* | *malM* | **2,30** | **2,07** | **2,31** | **3,57** | **12,88** |
| *spr1979* | *dltD* | 1,01 | 0,95 | 1,13 | 1,08 | **3,39** |
| *spr1980* | *dltC* | 1,22 | 1,38 | 1,25 | 1,27 | **3,37** |
| *spr1981* | *dltB* | 1,31 | 1,41 | 1,25 | **1,47** | **3,28** |
| *spr1982* | *dltA* | 1,12 | **1,19** | 1,05 | 1,30 | **2,30** |
| *spr2045* | *htrA* | 1,32 | **2,33** | **2,39** | **4,15** | **18,61** |
| *spr2046* | *spo0J* | 1,23 | 1,79 | 1,85 | **2,59** | **10,69** |

Aufgelistet sind die Gene des minimalen Cia-Regulons, welches in Tab. 1.1 definiert ist. Die Transkriptionsunterschiede wurden mit der Mikroarray-Technik bestimmt und gegen den Wildtyp R6 verglichen. Grün untermalte Werte sind < 0,7 (< 0,5 dunkelgrün), rot untermalt sind Werte > 1,4 (> 2 dunkelrot). Werte des Zwischenbereichs (0,7 – 1,4) haben keine farbige Untermalung. Das Ratio ist als $Wert_{Mutante}/Wert_{Wildtyp\ R6}$ dargestellt. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant.

Von den Genen des minimalen Cia-Regulons fallen in C103 nur die *mal*-Gene, *spr0782* und *spr0931* auf. Erst ab C203 und vor allem in C503 wurden die Gene des minimalen Cia-Regulons überwiegend unterschiedlich transkribiert. Die *lic*-Gene wurden zu keiner untersuchten Bedingung erfasst und stellen somit eine Ausnahme dar. Die Transkriptionsunterschiede in C403 ähnelten denen mit der KP3-Mutante (CiaH T230-Mutation, Cia „ON"). Die Unterschiede in C503 gingen aber über das Niveau der Cia „ON"-Mutante (KP3) hinaus (siehe Kapitel 3.7.2). *HtrA* zeigte in C503 einen 18-fachen, *malM* einen 13-fachen, *spr0782* einen 10-fachen und *ciaR* einen 7-fachen Transkriptionsunterschied. Die *man*-Gene wurden entsprechend ihrer umgekehrten Cia-Regulation kontinuierlich geringer transkribiert.

Da das Cia-System in C403 und C503 sehr stark aktiviert wurde, wurde nach Genen gesucht, die ein ähnliches Transkriptionsprofil wie die Gene des Cia-Regulons haben. Mit diesem Suchkriterium können eventuell neue Gene des Cia-Regulons entdeckt werden. In Tabelle 3.26 sind die Gene mit einem Transkriptionsmuster ähnlich denen des Cia-Regulons dargestellt.

**Tab. 3.26: Gene mit ähnlichem Transkriptionsprofil wie die Gene des Cia-Regulons**

| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | Genname |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0276* | 1,11 | **2,45** | **2,47** | **7,8** | **16,04** | *bglA* |
| *spr0277* | 1,17 | **2,73** | **2,50** | **11,32** | **16,58** | Hypoth. |
| *spr0278* | 1,06 | 1,20 | **1,67** | **3,82** | **6,93** | PTS-EII |
| *spr0279* | 1,12 | **1,25** | **1,73** | **5,22** | **10,16** | *bglG* |
| *spr0280* | 1,23 | **1,28** | **1,56** | **3,90** | **7,72** | PTS-EII |
| *spr0281* | 1,14 | 1,45 | 1,25 | **5,71** | **7,09** | Hypoth. |
| *spr0282* | 1,16 | 1,56 | 1,58 | **6,13** | **8,89** | PTS-EII |
| *spr0049* | 0,86 | 0,77 | 0,43 | **0,29** | 0,38 | *purN* |
| *spr0388* | 0,91 | 1,21 | 0,36 | **0,23** | **0,17** | Hypoth. |
| *spr0389* | 1,08 | 1,17 | 0,49 | **0,24** | **0,36** | Hypoth. |
| *spr0413* | 1,80 | 1,27 | **0,40** | **0,32** | **0,24** | *bacA* |

Dargestellt sind 10 Gene mit ähnlichem Transkriptionsmuster wie die Gene des Cia-Regulons. Die ersten 6 Gene werden ähnlich zu den Genen *htrA*, *spr0931*, *spr0782* und *ciaRH* transkribiert, die letzten 4 Gene zu den *manLMN*-Genen. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant. Grün untermalte Werte sind < 0,7 (< 0,5 dunkelgrün), rot untermalt sind Werte > 1,4 (> 2 dunkelrot). Werte des Zwischenbereichs (0,7 – 1,4) haben keine farbige Untermalung.

Insgesamt konnten 10 Gene mit ähnlichem Cia-Transkriptionsprofil gefunden werden. Darunter ist das *spr0276 – spr0282*-Regulon, das sich ähnlich zu den *htrA*, *spr0782*, *spr0931* und *ciaRH*-Genen verhielt. In C503 wurden diese Gene 7 – 16-fach stärker transkribiert als im Wildtyp. Die *spr0049*, *spr0388 – spr0389* und *spr0413*-Gene verhielten sich ähnlich den *manLMN*-Genen und wurden in C503 3 – 5-fach weniger transkribiert.
Die Gene *spr0276 – spr0282* stellen Gene eines PTS-Operons dar, welches wahrscheinlich für den Metabolismus von Cellobiose verantwortlich ist (Kilic *et al.*, 2004). Diese Gene sind auch in Kapitel 3.7.2 als Cia-reguliert aufgetreten (Tab. 3.17 und 3.18). *Spr0049* kodiert für ein Protein, welches an der Purin-Biosynthese beteiligt ist, und *spr0413* für ein Protein, welches Bacitracin-Resistenz vermitteln könnte. Beide Gene sind ebenfalls in Kapitel 3.7.2 als Cia-reguliert beschrieben (Tab. 3.21 und 3.22, Tab. 6.3 im Anhang). Die Gene *spr0388 – spr0389*, deren Genprodukte ohne bekannte Funktion sind, sind bislang noch nicht im Zusammenhang mit dem Cia-System aufgetreten.

Bei diesen globalen Transkriptionsanalysen wurden insgesamt 233 Gene in C103 bis C503 unterschiedlich transkribiert. Bei einer funktionellen Gruppierung dieser Gene fällt auf, dass diese zu den gleichen Gruppen gehören, wie die unter 3.7.2 beschriebenen Cia-regulierten Gene. 59 Gene gehören zum Kompetenz-Regulon, 30 sind Zuckerverwertungsgene, 26 Genprodukte haben Transportfunktion, 12 im Stickstoff-Metabolismus, 11 Genprodukte mit

zentralen Aufgaben der Zelle, 17 Gene des Cia-Regulons, 12 nicht gruppierbare Gene und 66 Gene ohne bekannte Funktion. Auffällig ist, dass einige Gene, deren Proteine im Zuckermetabolismus agieren, ähnlich unterschiedlich transkribiert wurden, wie die Gene des minimalen Cia-Regulons. *Spr0276 – spr0282*, *spr0358* und *spr1987 – spr1991* zeigten eine Steigerung des Transkriptionsunterschiedes von C103 – C503 und hatten Ratios in C503 von bis zu 16.
Das *pbp2a*-Gen, welches in C403 durch ein 8-bp-Repeat frühzeitig translationell terminiert wird, wurde in C403 und C503 signifikant weniger transkribiert als im Wildtyp. Dies bedeutet, dass der Abbruch der Translation und das Nicht-Vorhandensein dieses Proteins einen negativen Einfluss auf die Transkription dieses Gens oder die Stabilität der mRNA haben könnten.
Diese Daten belegen die Aktivierbarkeit des Cia-Systems durch PBP-Mutationen, da mit zunehmender Anzahl an PBP-Mutationen die Transkriptionsunterschiede zum Wildtyp R6 anstiegen. Das $CiaH_{C103}$-Allel alleine führte dagegen nur zu geringen Transkriptionsunterschieden.

## 3.9 Transkriptionsvergleich der spontanresistenten Labormutanten C503 und C606

Das Ziel dieser Experimente war es Transkriptionsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Mutanten, die zwar in dengleichen Genen betroffen sind, dort aber andere Mutationen aufweisen, zu finden. Dafür wurde die C606-Mutante (Laible und Hakenbeck, 1991) im Vergleich mit der C503-Mutante analysiert, weil diese aus einer anderen Mutanten-Familie stammt (Tab. 3.27).

**Tab. 3.27: Mutationen in den spontanresistenten Labormutanten C503 und C606**

| Selektionsstufe | C503 | C606 |
|---|---|---|
| 1. | CiaH A203V | PBP2x G601V |
| 2. | PBP2x G597D | PBP2x G597D |
| 3. | PBP2x T550A | CiaH T230P |
| 4. | $PBP2a^-$ | $PBP2a^-$ |
| 5. | PBP2x R426C | PBP2x M289T |
| 6. | | PBP2x G422D |

Dargestellt sind die Mutationen in den Mutanten C503 und C606, sowie deren Selektionsstufen (siehe auch Abb. 1.2).

Ebenfalls verschieden sind die CiaH-Mutationen, von denen schon gezeigt wurde, dass sie einen unterschiedlichen Aktivierungsgrad des Cia-Systems und entsprechend auch die Gene des minimalen Cia-Regulons, zur Folge haben. Deshalb erscheint auch in den hier untersuchten Stämmen eine unterschiedliche Aktivierung des Cia-Systems als Folge der unterschiedlichen CiaH-Mutationen und deren Aktivierbarkeit durch PBP2x-Mutationen wahrscheinlich.
Das Transkriptom von C606 wurde bei Nephelo 40 in CpH8-Medium gegen den Wildtyp verglichen. Die in diesem Experiment ermittelten Unterschiede wurden mit den differentiell transkribierten Genen in C503 (siehe Kapitel 3.8) abgeglichen.
Insgesamt wurden 163 (C503) bzw. 153 (C606) Gene als unterschiedlich transkribiert identifiziert. Diese wurden nach ihrer Zugehörigkeit zum Kompetenz-Regulon gruppiert (Peterson *et al.*, 2004). Die Gene, die nicht zum Kompetenz-Regulon gehören, wurden wiederum gruppiert in Gene, die in C503 und C606 als signifikant unterschiedlich aufgetreten sind und in Gene, die nur in C503 oder in C606 differentiell transkribiert wurden.

In Abb. 3.36 sind die Transkriptionsverhältnisse der Kompetenzgene dargestellt. Diese wurden in C503 und C606 deutlich weniger transkribiert als im Wildtyp.

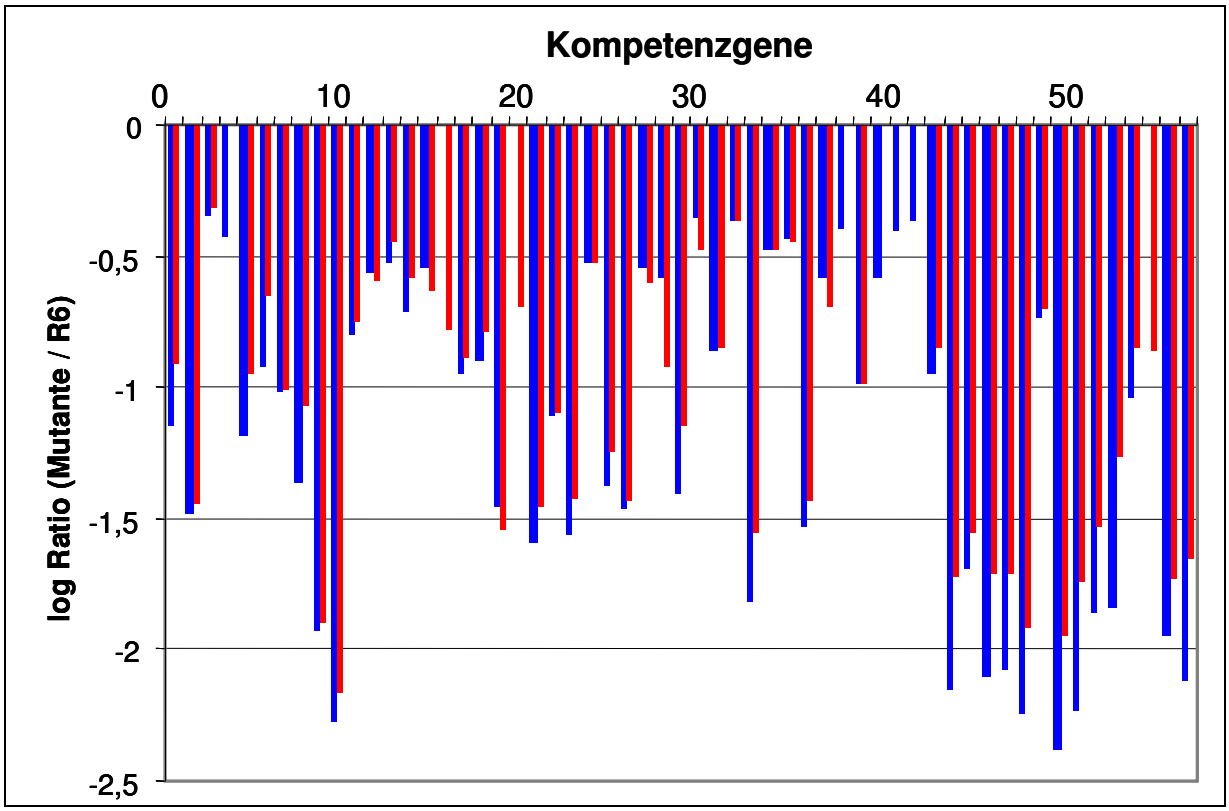



**Abb. 3.36: Gene des Kompetenz-Regulons in C503 und C606**
Dargestellt sind die Transkriptionsverhältnisse der Gene des Kompetenz-Regulons. Verglichen wurde die Transkription der Gene in C503 und C606 gegen den Wildtyp R6 in CpH8-Medium bei Nephelo 40. Die roten Balken stellen die Verhältnisse von C503 dar, die blauen die von C606. Wenn nur ein Balken abgebildet ist, fehlt der Wert der anderen Mutante. Die Ordinate ist in der logarithmierten Skalierung angegeben. Die Verhältnisse sind als $Wert_{Mutante}/Wert_{R6}$ dargestellt.

Der Transkriptionsunterschied der Kompetenzgene war in C503 und C606 sehr ähnlich und reichte von 0,47 (*spr1863*) bis 0,004 (*spr0023*). Im Allgemeinen waren die Differenzen jedoch im Schwankungsbereich, so dass von einer gleichen Repression der Kompetenzgene ausgegangen werden kann.

Einzelne Gene wurden spezifisch nur in C503 oder nur in C606 unterschiedlich zum R6-Stamm transkribiert (Tab. 3.28), der Großteil der Gene allerdings wurde fast identisch in C503 und in C606 reguliert. Alle Nicht-Komptenzgene, die in beiden Stämmen als signifikant unterschiedlich aufgetreten waren, sind in Abb. 3.37 dargestellt. Die Gene wurden zur besseren Übersicht in funktionelle Gruppen eingeteilt. Hier traten Transkriptionsdifferenzen sowohl zu Gunsten von R6, als auch von C503 bzw. C606 auf.

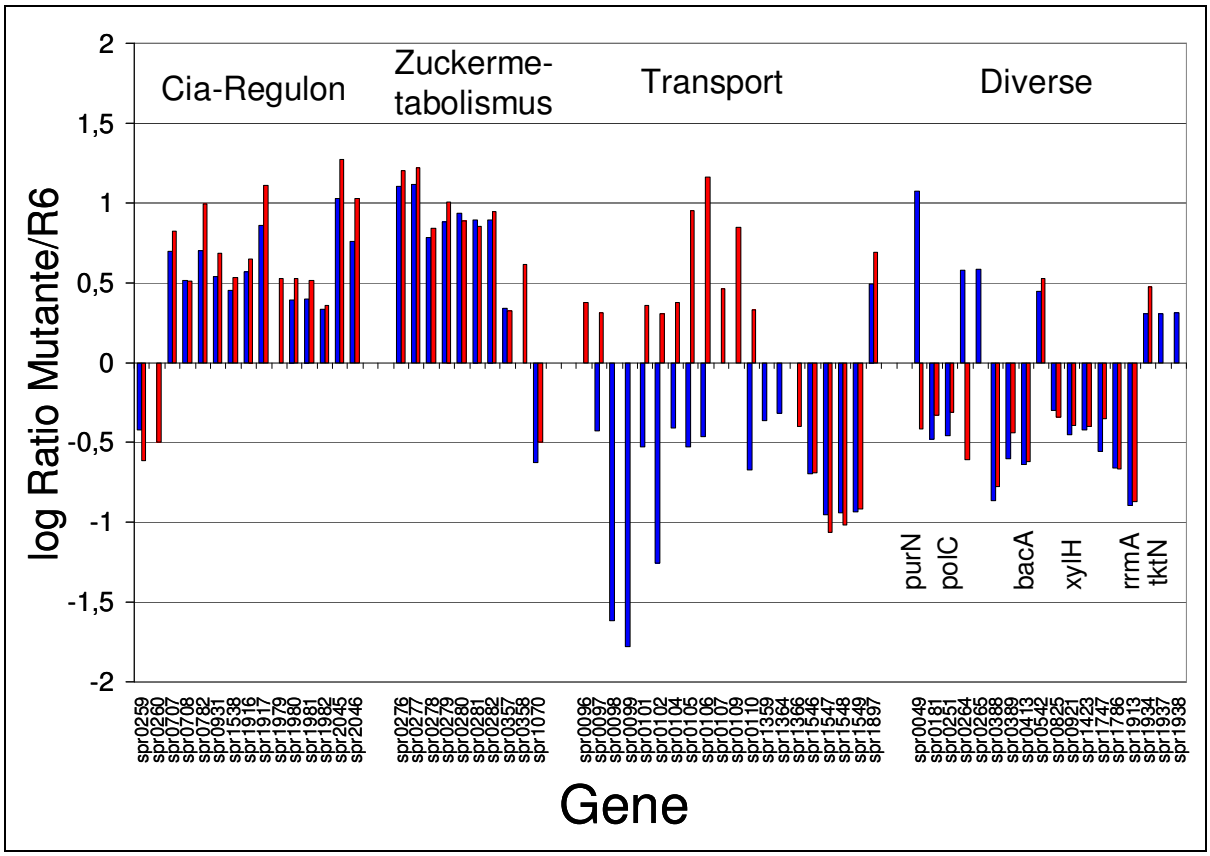



**Abb. 3.37: Vergleich der Transkriptionsverhältnisse von C503 und C606**
Dargestellt sind die Transkriptionsverhältnisse der Gene, die nicht zum Kompetenz-Regulon gehören, aber signifikant unterschiedlich in C503 und C606 zum Wildtyp R6 transkribiert wurden. Die roten Balken stellen die Verhältnisse von C503, die blauen Balken die von C606 dar. Wenn nur ein Balken abgebildet ist, fehlt der Wert der anderen Mutante. Die Abszisse zeigt die Anzahl der Gene, die Ordinate das $\log_{10}$ Ratio als Mutante – R6 – Verhältnis. Es wurden zwei unabhängige Kulturen untersucht.

Die Gene des Cia-Regulons wurden in C503 und C606 ähnlich stark reguliert, wobei noch eine Steigerung von C606 zu C503 erkannbar war. Das *htrA*-Gen wurde in C606 ca. 10-fach, in C503 ca. 18-fach unterschiedlich transkribiert. Die Gene, deren Produkte im Zuckermetabolismus agieren, wurden fast identisch in C503 und C606 reguliert. Größere Unterschiede fanden sich in der Gruppe der Transporter. Sehr verschieden wurden die Gene *spr0049*, *spr0096 – spr0110*, *spr0264* in C503 und C606 transkribiert. Diese Gene kodieren für ein Protein aus der Purinbiosynthese (*purN*, *spr0049*), eine Argininosuccinate-Synthase (*spr0102*) und –Lyase (*spr0103*) und ein Transportsystem für Aminosäuren (*spr0105* und *spr0106*) sowie ein hypothetisches Protein (*spr0264*). *Spr0098* und *spr0099*, die beide für hypothetische Proteine kodieren, wurden in C606 ca. 50-fach weniger transkribiert, die Gene für das Aminosäurentransportsystem (*spr0105 – spr0106*) wurden ca. 12-fach stärker in C503 transkribiert. Zusätzlich wurden *bacA* (*spr0413*) und *rrmA* (*spr1913*) in C503 und C606 weniger transkribiert. Die Gene *purN*, *xylH* und *tktN* lassen sich dem Stickstoffmetabolismus zuordnen. Diese zeigten keine einheitliche Regulation zwischen C503 und C606.

Die Gene, welche spezifisch in einem Stamm unterschiedlich transkribiert wurden und in dem anderen Stamm keine Differenzen aufwiesen, sind in Tabelle 3.28 aufgelistet. Unter diesen Genen befinden sich zusätzlich zu dem Purinbiosynthese-Operon (*spr0045 – spr0056*), welches in C606 ca. 12-fach stärker transkribiert wurde als im R6, überwiegend Einzelgene, die entweder monocistronisch transkribiert werden oder als einzelne Gene eines Operons auffielen. Das Purinbiosynthese-Operon war in C503 nicht als signifikant aufgetreten, da in diesem große Unterschiede zwischen den untersuchten C503-Kulturen vorhanden waren. In

der einen Kultur wurden diese Gene ähnlich wie in C606 transkribiert, in der anderen Kultur wie in R6. Um dieses zu klären, sind weitere Experimente notwendig.

**Tabelle 3.28: Transkriptionsunterschiede zwischen C503 und C606**

| Gennummer | C503 | Genname | Gennummer | C606 | Genname |
|---|---|---|---|---|---|
| *spr0062* | **0.41** | PTS-EIID | *spr0045* | **12.50** | *purC* |
| *spr0084* | **0.42** | konserviert hypothetisch | *spr0046* | **33.33** | *purL* |
| *spr0091* | **2.22** | konserviert hypothetisch | *spr0047* | **33.33** | *purF* |
| *spr0139* | **2.33** | *ugd* | *spr0048* | **33.33** | *purM* |
| *spr0168* | **2.33** | konserviert hypothetisch | *spr0050* | **33.33** | *vanZ* |
| *spr0286* | **2.27** | *hysA* | *spr0051* | **33.33** | *purH* |
| *spr0296* | **2.70** | konserviert hypothetisch | *spr0052* | **5.88** | *purD* |
| *spr0376* | **2.08** | konserviert hypothetisch | *spr0053* | **12.50** | *purE* |
| *spr0446* | **0.38** | *hsdS* | *spr0054* | **5.56** | *purK* |
| *spr0504* | **0.33** | *licT* | *spr0055* | **5.88** | hypothetisch |
| *spr0526* | **2.44** | *vex3* | *spr0056* | **5.56** | *purB* |
| *spr0587* | **2.04** | konserviert hypothetisch | *spr0059* | **0.46** | *bgaC* |
| *spr0621* | **2.44** | ABC-SBP-truncation | *spr0291* | **0.43** | PTS-EII |
| *spr0622* | **2.63** | *glnQ* | *spr0311* | **2.50** | hypothetisch |
| *spr0746* | **0.32** | *cdd* | *spr0327* | **0.28** | *aliA* |
| *spr0775* | **0.46** | konserviert hypothetisch | *spr0404* | **2.04** | hypothetisch |
| *spr0798* | **2.08** | hypothetisch | *spr0551* | **0.50** | *brnQ* |
| *spr0884* | **2.56** | *ppmA* | *spr0571* | **0.50** | konserviert hypothetisch |
| *spr0935* | **0.45** | ABC-MSP | *spr0691* | **0.45** | *bioY* |
| *spr0936* | **0.35** | ABC-MSP | *spr0780* | **0.50** | *fruA* |
| *spr0956* | **2.50** | hypothetisch | *spr0786* | **2.38** | hypothetisch |
| *spr0968* | **0.50** | hypothetisch | *spr1109* | **2.33** | *Fhs* |
| *spr1006* | **0.43** | *rluD* | *spr1120* | **0.47** | *glnP* |
| *spr1040* | **0.45** | *rexA* | *spr1128* | **4.00** | *guaC* |
| *spr1194* | **0.41** | *appA* | *spr1184* | **6.25** | hypothetisch |
| *spr1207* | **2.04** | hypothetisch | *spr1346* | **0.31** | hypothetisch |
| *spr1296* | **3.45** | hypothetisch | *spr1380* | **2.00** | ABC-MSP-truncation |
| *spr1322* | **2.04** | *pdx1* | *spr1381* | **2.33** | ABC-MSP-truncation |
| *spr1407* | **0.47** | hypothetisch | *spr1441* | **3.03** | *oxlT* |
| *spr1436* | **0.36** | konserviert hypothetisch | *spr1452* | **0.30** | hypothetisch |
| *spr1524* | **0.40** | konserviert hypothetisch | *spr1512* | **2.44** | hypothetisch |
| *spr1672* | **3.23** | *czcD* | *spr1623* | **0.40** | hypothetisch |
| *spr1674* | **2.17** | konserviert hypothetisch | *spr1647* | **2.08** | *galE* |
| *spr1686* | **2.44** | *fecE* | *spr1663* | **4.76** | *pbuX* |
| *spr1845* | **2.38** | *sga* | *spr1755* | **0.23** | hypothetisch |
| *spr1885* | **0.50** | ABC-NP | *spr1800* | **4.00** | hypothetisch |
| *spr1945* | **3.33** | *pcpA* | *spr1801* | **5.88** | ABC-NBD |
| *spr1951* | **2.22** | konserviert hypothetisch | *spr1802* | **4.17** | konserviert hypothetisch |
| *spr1952* | **4.55** | konserviert hypothetisch | *spr1811* | **0.45** | konserviert hypothetisch |
| *spr1953* | **3.33** | konserviert hypothetisch | *spr1829* | **0.23** | *nadC* |
| *spr1964* | **2.22** | *fucI* | *spr1882* | **2.33** | *gpi* |
| *spr1990* | **2.38** | glpD-truncation | *spr1912* | **0.47** | hypothetisch |
| *spr1991* | **3.45** | *glpK* | | | |
| *spr2039* | **2.22** | konserviert hypothetisch | | | |

Dargestellt sind globale Transkriptionsanalysen von den spontanresistenten Labormutanten C503 und C606. In dieser Tabelle sind die Gene aufgezeigt, die nicht zum Kompetenz-Regulon gehören und entweder in C503 oder in C606 (aber nicht in beiden) differentiell transkribiert wurden. Das Ratio ist als $Wert_{Mutante}/Wert_{R6}$-Verhältnis gezeigt. Transkriptionseinheiten wurden zusammengefasst. Grün untermalte Werte sind < 0,7 (< 0,5 dunkelgrün), rot untermalt sind Werte > 1,4 (> 2 dunkelrot). Werte des Zwischenbereichs (0,7 – 1,4) haben keine farbige Untermalung. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant (FDR < 1%).

Obwohl die Transkription von 86 Genen in diesen beiden Mutanten unterschiedlich war (Tab. 3.28), gehörte ein großer Teil davon ähnlichen Familien an: Zuckermetabolismus und –transport (C503 = 18%, C606 = 14%), allgemeiner Transport (C503 = 25%, C606 = 19%) sowie ohne bekannte Funktion (C503 = 45%, C606 = 35%). Es ist auffällig, dass alle PTS-Gene ca. 2-fach weniger in C503 und C606 transkribiert wurden.

In den Genen *spr0096 – spr0110* fanden sich eindeutige und große Unterschiede zwischen C503 und C606. Der 15 Gene-Locus *spr0096 – spr0110* besteht aus acht hypothetischen Proteinen, fünf Transportern (*spr0099 – spr0101*, *spr0105*, *spr0106*) sowie einer Argininosuccinat-Synthase (*spr0102*) und einer Argininsuccinat-Lyase (*spr0103*). Die beiden letzten Proteine sind im Aminosäurestoffwechsel beteiligt.
Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten zeigen, dass sich sowohl die CiaH A203V als auch die CiaH T230P-Mutation durch PBP-Mutationen aktivieren lassen. Für beide CiaH-Allele gilt, dass sie in Kombination mit PBP-Mutationen ähnlich hohe Transkriptionsniveaus der Cia-Zielgene erreichten. Erstaunlicherweise ließ sich die CiaH A203V-Mutation sogar stärker aktivieren als die CiaH T230P-Mutation, obwohl die CiaH T230P-Mutation alleine eine stärkere Aktivierung verursachte (siehe Kapitel 3.7.2).

## 3.10 Das Cia-System und Vancomycinbehandlung

Die Bedeutung des Cia-Systems unter verschiedensten Bedingungen, die die Integrität der Zellwand betreffen, wurde in den Kapiteln 3.1 – 3.3 näher beschrieben. Daher wurde jetzt untersucht, ob tatsächlich die Behandlung mit Zellwand-aktiven Wirkstoffen direkt eine Aktivierung des Cia-Systems zur Folge hat, wobei stellvertretend Vancomycin verwendet wurde. Dabei wurde nur 1/10 der MHK als Arbeitskonzentration verwendet, da a) aus anderen Arbeiten hervorging, dass Effekte auch durch subinhibitorische Konzentrationen verursacht werden (Mascher *et al.*, 2003; Fouseca *et al.*, 2004) und b) Lyseeffekte vermieden werden sollten. Dabei sollte das hier vorgestellte Experiment lediglich als Vorversuch dienen, da nur ein Zeitpunkt bei einer Konzentration untersucht wurde. Für eine detailliertere Analyse müssten auch weitere Antibiotika in die Untersuchungen aufgenommen werden.
Die Wildtyp R6-Kultur wurde ab Nephelo 30 geteilt und ein Teil wurde für 10 Minuten mit 0,25 µg/ml Vancomycin (= ca. 1/10 der MHK) inkubiert, der andere Teil blieb unbehandelt. Beide Kulturen wurden schließlich geerntet und die Transkriptome miteinander verglichen. Signifikante Gene (FDR < 1%) wurden, wie unter Kapitel 2.19 beschrieben, identifiziert. Die unterschiedlich transkribierten Gene sind in Tabelle 3.28 aufgelistet.

**Tab. 3.28: Vancomycin induzierte Gene in *S. pneumoniae* R6**

| Gennummer | Ratio | Genname |
|---|---|---|
| *spr0013* | **0.5** | *comX* |
| *spr0030* | **0.5** | hypoth. |
| *spr0031* | **0.4** | hypoth. |
| *spr0088* | **2.0** | hypoth. |
| *spr0096* | **2.0** | hypoth. |
| *spr0127* | **0.5** | orf51 |
| *spr0128* | **0.5** | hypoth. |
| *spr0782* | **2.0** | hypoth. |
| *spr0812* | **2.0** | ABC-NBD |
| *spr0856* | **0.5** | *celA* |
| *spr0996* | **0.5** | *radC* |
| *spr1144* | **0.4** | *Smf* |
| *spr1493* | **0.5** | *psaC* |
| *spr1831* | **0.5** | hypoth. |
| *spr1873* | **2.0** | hypoth. |
| *spr1875* | **2.5** | hypoth. |
| *spr2006* | **0.4** | *cbpD* |
| *spr2012* | **0.4** | *comFC* |
| *spr2013* | **0.4** | *comFA* |
| *spr2045* | **2.0** | *htrA* |

*S. pneumoniae* R6 Zellen wurden für 10 Minuten ab Nephelo 30 mit 0,25 µg/ml Vancomycin behandelt. Signifikant unterschiedlich transkribierte Gene sind in dieser Tabelle aufgelistet. Das Ratio ist das Verhältnis aus der Transkription von induzierten geteilt durch die Transkription von uninduzierten Zellen. Es wurden zwei unabhängige Kulturen untersucht. Blau unterlegt sind Gene des Kompetenz-Regulons, rot des Cia-Regulons und die Gene ohne farbliche Markierung konnten keinem Regulon zugeordnet werden. Alle Werte sind statistisch signifikant (FDR < 1%).

Die Transkriptionsdaten in Tabelle 3.28 zeigen, dass durch 0,25 µg/ml Vancomycin nur wenige Gene, und diese auch nur sehr schwach, induziert wurden. Es wurde unter diesen Bedingungen kein Gen mehr als 2,4-fach induziert oder reprimiert. Weiterhin ist auffällig, dass sich unter den selektierten Genen viele Kompetenzgene befinden (*spr0013*, *spr0030*, *spr0031*, *spr0127*, *spr0128*, *spr0856*, *spr0996*, *spr1144*, *spr1831*, *spr2006*, *spr2012*, *spr2013*), welche ca. 2-fach herunterreguliert wurden (blau untermalte Gene). Nur 2 Gene, die ca. 2-fach durch Vancomycin induziert wurden, gehören zum Cia-Regulon (*spr0782*, *spr2045*, rot untermalt). Sechs Gene können keinem Regulon zugeordnet werden: *spr0088*,

*spr0096*, *spr0812*, *spr1873* und *spr1875* wurden 2-fach induziert, *spr1493* wurde 1,9-fach reprimiert (ohne farbliche Markierung).
Dieses Vorexperiment lässt vermuten, dass eine Induktion des Cia-Systems durch Vancomycin möglich erscheint. Die *ciaRH*-Gene selbst traten nicht in dieser Liste auf, da geringe Transkriptionsunterschiede der *ciaRH*-Gene zu großen Veränderungen in den Cia-Zielgenen führen.

# 4. Diskussion

Zentraler Inhalt der vorliegenden Arbeit war einerseits die Charakterisierung des Cia-Systems anhand phänotypischer Merkmale und andererseits globale Transkriptionsanalysen von Cia-Mutanten nach erfolgreicher Etablierung der Mikroarray-Technik. Der erste Teil beschäftigte sich mit folgenden Themengebieten:

1. Der Rolle des Cia-Systems bei Schädigungen der Zellwandsynthese
2. Dem Zusammenhang zwischen dem Cia-System und PBP2x-Mutationen
3. Der Bedeutung von ausgewählten Cia-Zielgenen für Cia-vermittelte Phänotypen
4. Der potentiellen Vernetzung anderer Regulationssysteme mit dem Cia-System

Im zweiten Teil wurden Cia-Mutationen mit Hilfe von globalen Transkriptionsanalysen charakterisiert. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

5. Welche Gene werden durch das Cia-System reguliert?
6. Was bewirkt die Kombination von CiaH- und PBP-Mutationen bezüglich des Transkriptoms?
7. Wird das Cia-System durch Zellwandschädigungen induziert?

In dieser Diskussion werden die Ergebnisse unter funktionellen Aspekten zusammengeführt und diskutiert. Dabei soll berücksichtigt werden, dass die einzelnen Phänotypen oft nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, sondern in einem komplexen Lebenwesen in Zusammenhang stehen.

## 4.1 Das Cia-System und PBP-Mutationen

### 4.1.1 Die Notwendigkeit eines funktionellen Cia-Systems in Anwesenheit von PBP-Mutationen

In spontanresistenten Labormutanten, die auf Cefotaxim selektioniert wurden, traten neben PBP- auch immer CiaH-Mutationen auf. Ob es tatsächlich zwischen diesen Mutationen einen Zusammenhang gibt, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Veränderungen in PBP2x sind eine Vorraussetzung für die Ausbildung von hoher β-Laktam-Resistenz, welche durch Mutationen in Klasse A hoch-molekularen PBPs verursacht wird. Die Resistenz wird durch Mutationen verursacht, die die Affinität des Proteins zum Inhibitor vermindern. Da es kein *in vitro* Testsystem für die natürliche PBP-Enzymaktivität gibt, bleibt der Einfluss dieser Mutationen auf die aktuelle Enzymfunktion unklar. Bisher wurde davon ausgegangen, dass PBP2x-Mutationen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben, da keine Wachstumsdefekte in PBP-Mutanten beobachtet wurden. Deshalb war es überraschend, dass PBP2x-Mutationen in Kombination mit der Inaktivierung des Cia-Systems solche dramatischen Wachstumseffekte hatten (siehe Kapitel 3.2). Dabei fällt auf, dass die Auswirkungen von unterschiedlichen PBP2x-Mutationen im Cia „OFF"-Hintergrund sehr stark variierten. Im Fall der PBP2x G597D-Mutation (C203-Stamm) führte die Inaktivierung des Cia-Systems nur zu geringen phänotypischen Veränderungen (siehe Abb. 3.4). Im Gegensatz dazu führte der Verlust des Cia-Systems im C303-Hintergrund (PBP2x G597D und T550A) zu einer Verringerung der Generationszeit und einer verstärkten Autolyse. Die PBP2x T550A-Mutation ist ungewöhnlich, da sie Cefotaxim-Resistenz aber eine Hypersensitivität gegen Penicillin vermittelt, unabhängig von weiteren Resistenz-verursachenden Mutationen (Coffey *et al.*, 1995; Grebe und Hakenbeck, 1996). Mutationen an dieser Position üben wahrscheinlich Effekte auf die Transpeptidaseaktivität aus (Mouz *et al.*, 1999). Mit einem stark veränderten PBP2x aus klinischen Isolaten ($PBP2x_{2349}$), welches insgesamt 62 Aminosäureveränderungen aufweist, konnten nur geringe Wachstumseffekte durch Inaktivierung des Cia-Systems beobachtet werden.

Die Wachstumseffekte bei inaktiviertem Cia-System sind aber nicht auf Mutationen in dem PBP2x beschränkt, sondern auch bei fehlendem PBP2a und – geringer, aber reproduzierbar – bei fehlendem PBP1a vorhanden. Die Abwesenheit von PBP2a vermittelt ebenfalls Resistenz, wie am Beispiel von Mutationen in spontanresistenten Labormutanten beobachtet wurde. Keine Effekte konnten in Kombination mit einem klinischen PBP2b-Allel und mit fünf veränderten PBP-Proteinen ($R6_T$-CCCB-Stamm) erkannt werden. In beiden Fällen – ebenso wie bei dem $PBP2x_{2349}$-Allel – stammen die Allele aus klinischen Isolaten. Damit ist ein großer Unterschied bezüglich der Bedürftigkeit des Cia-Systems zwischen PBP-Allelen aus dem Labor und PBP-Allelen aus klinischen Isolaten vorhanden. In der Evolution von klinischen Isolaten außerhalb des Labors haben wahrscheinlich kompensatorische Mutationen stattgefunden, die möglicherweise die Auswirkungen von resistenzvermittelnden Mutationen hinsichtlich Proteinstabilität und –aktivität modifizieren. Solche kompensatorischen Mutationen wurden bislang intragenisch (Fermer und Swedberg, 1997; Nagaev *et al.*, 2001) und intergenisch (Reynolds, 2000; Maisnier-Patin *et al.*, 2002) gefunden. Dass kompensatorische Mutationen auch bei PBP-Proteinen eine große Rolle spielen und nicht nur für die Resistenz, sondern auch für die Virulenz wichtig sind, konnten Smith und Klugman (2005) und Rieux *et al.* (2001) zeigen. Möglicherweise stellt das Cia-System ein solches intergenisches kompensatorisches System dar. Einzelne PBP2x-Punktmutationen benötigen das Cia-System, wohingegen bei $PBP2x_{2349}$ und in dem $R6_T$-CCCB-Stamm weitere intragenische kompensatorische Mutationen aufgetreten sind, die die Notwendigkeit für ein funktionelles Cia-System reduzieren.

### 4.1.2 Die Aktivierung des Cia-Systems durch PBP-Mutationen

Die beiden PBP2x-Mutationen aus C303 (PBP2x G597D und T550A) wurden mit drei verschiedenen Aktivierungszuständen des Cia-Systems analysiert: a) mit komplett fehlendem und damit inaktiviertem Cia-System (C303R$^-$H$^-$), b) im Wildtyp-Hintergrund (R6$_{pbp2x}^{C303}$) und c) mit dem CiaH A203V-Allel (C303), das in der C003-Mutantenfamilie vorkommt. Im Wildtyp-Hintergrund waren keine phänotypischen Veränderungen sichtbar (Mascher, 2001) und es fand auch keine über das Wildtyp-Niveau hinausgehende Aktivierung des Cia-Systems statt (siehe Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu kann das CiaH A203V-Allel als Basis für eine weitere Aktivierung des Cia-Systems in Anwesenheit von PBP2x-Mutationen angesehen werden, weil nur mit dieser Mutation eine Aktivierung des Cia-Systems in Kombination mit PBP2x-Mutationen gefunden wurde.

Für die Mutantenfamilie C003 wurde eine kontinuierliche Steigerung in der Transkription der Cia-Zielgene (Ausnahmen *lic*- und *man*-Gene) von C103 zu C503 nachgewiesen (siehe Tab. 3.25), so dass mit jeder neuen PBP-Mutation eine weitere Steigerung der Transkription induziert wurde. Für die C606-Mutante wurde eine Transkriptionsstärke ähnlich der von C503 nachgewiesen (siehe Abb. 3.37), die weit über die Transkriptionsstärke hinausgeht, die allein von der CiaH$_{C306}$-Mutation ausgelöst wurde. Demnach muss das basal-aktivierte Cia-System, in Form des CiaH$_{C103}$ A203V- oder des CiaH$_{C306}$ T230P-Allels, die Auswirkungen der PBP-Mutationen detektieren können. Welche das sind, ist bislang ungeklärt.

Die CiaH$_{C306}$-Mutation verursacht einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin in der H-Box, in der Nähe des konservierten Histidins an Position 226 (siehe Abb. 4.1). Der Austausch ist analog zu einem Aminosäureaustausch Threonin zu Arginin im EnvZ-Protein (Aiba *et al.*, 1989), welcher dort zu einem Verlust der Phosphatase- jedoch nicht der Kinase-Aktivität führt. Die Folge dieser Mutation ist eine erhöhte Phosphorylierung des RR OmpR und damit einhergehend eine Aktivierung der TCS. Eine ähnliche Situation wurde für das CiaH$_{C306}$-Allel geschlussfolgert (Guenzi *et al.*, 1994). Die Bedeutung des CiaH$_{C103}$-Allels ist schwieriger zu verstehen. In Analogie zur Struktur des EnvZ-Proteins (Tomomori *et al.*, 1999) liegt die CiaH$_{C103}$-Mutation weit außerhalb des katalytischen Zentrums am Ende der zweiten Transmembrandomäne (Abb. 4.1). Deshalb ist ein Einfluss auf die enzymatische Aktivität eher unwahrscheinlich. Stattdessen kann eine mögliche Inhibition der Signalweiterleitung von der Sensordomäne zur Kinasedomäne diskutiert werden. Obwohl aufgrund der phänotypischen Beobachtungen und der Transkriptionsanalysen eine ähnliche Wirkung beider Mutationen angenommen werden sollte, sind zur Zeit noch keine Hinweise auf die molekulare Bedeutung der CiaH$_{C103}$-Mutation vorhanden.

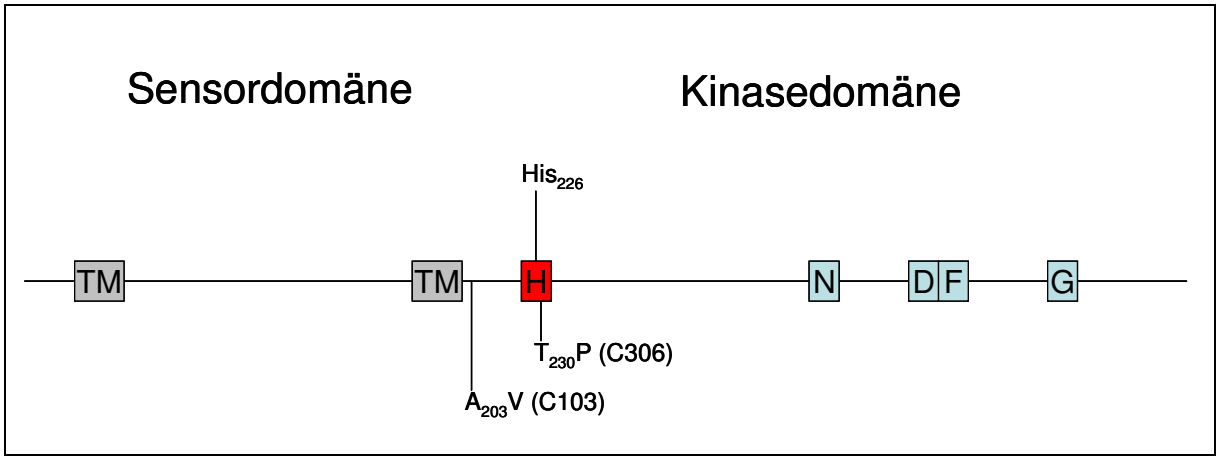



**Abb. 4.1: Die Aminosäureaustausche der CiaH$_{C103}$- und der CiaH$_{C306}$-Mutationen**

Dargestellt ist das CiaH-Protein als schwarze Linie. Eingezeichnet sind weiterhin konservierte Sequenzmerkmale und die Aminosäureveränderungen von der CiaH$_{C103}$- und der CiaH$_{C306}$-Mutation. TM = Transmembrandomäne, H = H-Box, N = N-Box , D = D-Box, F = F-Box, G = G-Box.

Das Gen, welches am stärksten durch das Cia-System reguliert wird, ist *htrA*. Dieses Gen kodiert für eine extracytoplasmatische Serinprotease, welche temperaturabhängig als Chaperon oder als Protease agieren kann. Möglicherweise kann über die Chaperonaktivität dieses Proteins der Zusammenhang zwischen dem Cia-System und den PBP-Proteinen erklärt werden. Es gibt Hinweise von *E. coli* und *Haemophilus influenzae*, dass die PBP-Proteine in einem Multienzymkomplex vorliegen (Höltje, 1996, 1998; Alaedini und Day, 1999). Ein Multienzymkomplex benötigt zu seiner Bildung Hilfsproteine, möglicherweise auch Chaperone. Ein solches Chaperon könnte HtrA darstellen. Die Bildung von Multienzymkomplexen dürfte erschwert sein, wenn einzelne Proteine Aminosäureveränderungen haben, da aufgrund von Veränderungen in der Proteinstabilität oder -faltung die Protein-Protein-Interaktion negativ beeinflusst sein könnte. Die Abwesenheit von Chaperonen wiegt besonders schwer, wenn Mutationen die Bildung des Multienzymkomplexes erschweren. Eine weitere Möglichkeit den Zusammenhang zwischen dem Cia-System und PBP-Proteinen zu erklären, stellt der mögliche Einfluss der PBP-Mutationen auf die Enzymfunktion dar, in deren Folge die Bildung der Zellwandstruktur verändert sein könnte. Diese Veränderung wird durch das Cia-System erkannt bzw. bedarf besonders der Proteine des Cia-Regulons. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das *htrA*-Gen in einem Hintergrund mit PBP-Mutationen zu inaktivieren, um die oben skizzierte Hypothese zu überprüfen.
Insgesamt konnten in C503 und C606 neben dem Kompetenz- und dem Cia-Regulon drei funktionelle Gengruppen definiert werden, die unterschiedlich in C503 bzw. C606 zum Wildtyp R6 transkribiert wurden: Gene des Zuckermetabolismus, des Stickstoffmetabolismus und des Transports. In einer ähnlichen Studie, in der Proteomanalysen von spontanresistenten Labormutanten (Penicillinresistenz) durchgeführt wurden, wurden ebenfalls u.a. ein Substratbindeprotein eines ABC-Transporters (PstS) und Zuckerstoffwechselproteine unterschiedlich exprimiert (Soualhine *et al.*, 2005). Jedoch ist keines der von Soualhine *et al.* beschriebenen Proteine in dieser Arbeit mehr als 2-fach reguliert. Trotzdem zeigt der Vergleich, dass durch 2 unabhängige Arbeiten im Labor selektierte β-Laktam-Resistenz die gleichen funktionellen Gruppen reguliert werden. Soualhine *et al.* konnten die Beteiligung von PstS an der Penicillinresistenzausprägung nachweisen, so dass möglicherweise auch die hier aufgeführten Transporter an der Resistenzausprägung beteiligt sind. Besonders der *spr0096 – spr0110*-Genlocus, der ein Transportsystem für Aminosäuren beinhaltet, ist offenbar generell bei β-Laktam-Resistenz in Labormutanten wichtig, da diese Gene auch noch in einer weiteren unabhängigen Mutantenfamilie aufgetreten sind (C. Volz, pers. Mitteilung). Transportproteine können nicht nur an β-Laktam-Resistenz beteiligt sein, sondern sie wurden auch in Transkriptionsanalysen von hoch Vancomycin-resistenten *S. aureus* stärker transkribiert (Mongodin *et al.*, 2003). Phänotypisch beobachtete Resistenzen scheinen öfters mit unerwarteten Expressionsveränderungen einherzugehen. Cash *et al.* (1999) identifizierten GAPDH als Erythromycin-Resistenzprotein in *S. pneumoniae*.

### 4.1.3 Das Cia-System schützt vor Zelllyse und vermittelt Resistenz gegen Zellwandinhibitoren

**Zelllyse**

Die zelluläre Lyse ist an die Aktivität des Autolysins LytA gebunden. Diese stellt eine N-Acetyl-Muramyl-L-Amidase dar und ist ein Cholin-Bindeprotein (Höltje und Tomasz, 1976). Es wird als inaktive Form produziert, aber nicht sekretiert. Es erhält erst nach Bindung an Cholin-haltige Teichonsäuren seine volle Aktivität. Bis jetzt sind aber weder die genaue Lokalisation noch die Art der Aktivierung vollständig verstanden (Briese und Hakenbeck, 1985; Garcia *et al.*, 1994).

Neben der Lyse in der stationären Phase, welche Autolyse genannt wird, gibt es die induzierte Lyse. Die Autolyse wird durch einen bisher unbekannten Mechanismus durch das Erreichen der stationären Phase ausgelöst, wohingegen die induzierte Lyse durch antibakterielle Substanzen ausgelöst werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten antibakteriellen Substanzen sind einerseits Zellwandinhibitoren, andererseits Detergenzien und biologisch aktive Peptide. Durch die Zellwandinhibitoren, die in verschiedenen Stufen der Zellwandbiosynthese eingreifen und zu komplett verschiedenen Antibiotika-Klassen gehören, wurde die Zellwandbiosynthese inhibiert und es entstanden Zellwandschäden. Detergenzien und die biologisch aktiven Peptide Nisin und Gallidermin führen zu Schäden in der Cytoplasmamembran. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Aktivierungszustände des Cia-Systems verschieden auf die Induktion der Zelllyse reagieren. So schützte die Aktivierung des Cia-Systems durch die $CiaH_{C306}$ T230P-Mutation vor der Zelllyse. Im Gegensatz dazu konnte bei inaktiviertem Cia-System die Zelllyse verstärkt ausgelöst werden (siehe Abb. 3.2). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung scheint das Cia-System durch Vancomycin aktiviert zu werden (siehe Tab. 3.28) und in einer Vancomycin-toleranten Mutante aktiviert zu sein (Haas *et al.*, 2005).

Ähnlich führten auch PBP-Mutationen bei Inaktivierung des Cia-Systems zu verstärkter Autolyse. Das könnte bedeuten, dass die PBP-Mutationen auch zu Zellwandschäden führen. In allen beschriebenen Fällen schützte ein aktiviertes Cia-System vor Zelllyse.

Wie oben erwähnt, erhält das LytA-Protein erst durch Bindung an Cholin-haltige Teichonsäuren seine aktive Form. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des LytA-Proteins und der Cia-Regulation der *lic*-Gene. Die *lic*-Gene kodieren für Proteine, die an der Teichonsäure-Biosynthese inklusive des Cholineinbaus in die Teichonsäuren beteiligt sind. Wand- und Lipoteichonsäuren sind essentielle Komponenten der Gram-positiven Zellwand und spielen eine zentrale Rolle in *S. pneumoniae* bei der Virulenz und der zellulären Lyse. Durch das Cia-System werden fünf des acht-Gene umfassenden *lic*-Locus reguliert. Die *lic*-Gene wurden erst in der stationären Phase deutlich stärker transkribiert (siehe Tabelle 3.11). Deshalb waren wahrscheinlich die Auswirkungen der Cia-abhängigen Regulation der *lic*-Gene bei hoher Zelldichte viel deutlicher als zu den anderen Zelldichten (siehe Tabelle 3.15).

Da das LytA-Protein zum Kompetenz-Regulon gehört, gibt es möglicherweise noch einen weiteren indirekten Zusammenhang. Dieser basiert auf der Tatsache, dass bei aktiviertem Cia-System (Cia „ON“) die Kompetenzgene z.T. reprimiert sind, im Gegensatz zu der De-Reprimierung bei inaktiviertem Cia-System. Wenn das Cia-System fehlt, wurde das Kompetenz-Regulon besonders in THB-Medium mehr transkribiert (Tab. 3.16). Dadurch wird mehr LytA-Protein hergestellt, so dass eine stärkere Autolyse ausgeführt werden kann. Der umgekehrte Zusammenhang könnte bei Aktivierung des Cia-Systems vorliegen.

Ob die Menge an LytA-Protein für die Zelllyse-Effekte des Cia-Systems verantwortlich ist, könnte durch Versuche mit $ComC^-$-Mutanten, die keine Kompetenz mehr entwickeln, untersucht werden. Wenn in einer Cia „OFF“-Mutante die Zelllyse unabhängig vom

Kompetenzstatus aktiviert werden kann, muss der Zusammenhang zwischen Zelllyse und Kompetenz als indirekt angesehen werden.

**Resistenz**

Punktmutationen in dem CiaH-Protein wurden aufgrund der Auswirkungen auf die Cefotaxim-Resistenz gefunden (Guenzi *et al.*, 1994).

In dieser Arbeit wurde die Resistenz von Cia-Mutanten gegenüber Zellwand-Antibiotika analysiert. Dabei zeigte sich ein eindeutiger Unterschied bei Vancomycin, Bacitracin und Cefotaxim zu der KP1- (Cia „OFF) und der KP3-Mutante (Cia „ON“) und bei D-Cycloserin, Phosphomycin und Nisin vor allem zu der KP3-Mutante. Dies weist darauf hin, dass das Cia-System nicht spezifisch für ein Antibiotikum ist, sondern eine allgemeinere Protektion bei Zellwandschäden bewirkt. Dieser vermittelte Schutz ist nur sehr gering (2-facher Unterschied bei Cefotaxim) und das Konzentrationsfenster für diese Unterschiede in den Cia-Mutanten sehr eng.

Eine mögliche Erklärung für die Resistenz, könnte der Zusammenhang zwischen dem Cia-System und der Zelllyse sein. Demnach würde die geringere Zelllyse bei aktiviertem Cia-System eine höhere Resistenz verursachen. Allem Anschein nach wird die Zelllyse aber auf Festmedium aufgefangen, so dass die Unterschiede auf Festmedium nicht so gut sichtbar waren wie in Flüssigmedium (Kapitel 3.1).

Dieser allgemeine Mechanismus könnte durch Veränderungen in der Zellwand verursacht werden. Die *lic*-Gene wurden schon oben erwähnt. Die *dlt*-Gene führen zu dem Einbau von D-Alanin in die Teichonsäuren und wurden oft in Zusammenhang mit Resistenz diskutiert (Peschel *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2002). Kovacs (2005) konnte jedoch zeigen, dass das *dltA*-Gen in *S. pneumoniae* R6 nicht translatiert wird und dadurch kein D-Alanin in die Teichonsäuren eingebaut wird. Folgerichtig wurde kein Einfluss des *dltA*-Gens auf die β-Laktam-Resistenz in der KP3-Mutante (Cia „ON“) und im Wildtyp R6 gefunden (siehe Kapitel 3.4). Von Mascher (2001) wurde jedoch berichtet, dass die Inaktivierung des *dltA*-Gens in der C303-Mutante die β-Laktam-Resistenz reduziert. Die Schlussfolgerung, dass die *dlt*-Gene an der β-Laktam-Resistenz der C303-Mutante beteiligt sind, ist damit aber eher unwahrscheinlich.

Die *man*-Gene könnten ebenfalls an diesem Mechanismus beteiligt sein. In *S. salivarius* wurde der Einfluss des Mannose-PTS auf die Kontrolle von mehreren zellulären oder physiologischen Funktionen nachgewiesen, die die Zellhülle beeinflussen (Brochu *et al.*, 1993; Lapointe *et al.*, 1993). So zeigten *manL*-defiziente Mutanten eine veränderte Sensitivität gegenüber verschiedenen toxischen Substanzen, die mit Zellhüllenfunktionen interagieren.

Wahrscheinlich ist nicht ein System alleine für den allgemeinen Schutzmechanismus verantwortlich, sondern die Kombination von mehreren Möglichkeiten.

### 4.1.4 Das Cia-System und Kompetenz

Die Kompetenz in *S. pneumoniae* wird über ein Quorum Sensing System gesteuert, wobei die Konzentration des CSP-Peptids entscheidend ist (siehe Kapitel 1.5). Der Zusammenhang zwischen dem Cia-System und der Kompetenz wurde schon von Guenzi *et al.* (1994) bemerkt. Die Punktmutation $CiaH_{C306}$ T230P vermittelt eine Kompetenzdefizienz. Im Gegenzug wird durch Inaktivierung des Cia-Systems die Kompetenz erhöht. Diese Beobachtung ist in THB-Medium, in dem *S. pneumoniae* natürlicherweise nicht kompetent wird, sehr viel ausgeprägter als in CpH8-Medium (Mascher, 2001). Alle bisherigen Transkriptionsanalysen haben die phänotypischen Beobachtungen dieses Zusammenhangs bestätigt. So wird das Kompetenz-Regulon entsprechend den Beobachtungen durch Cia-Inaktivierung stärker, durch die $CiaH_{C306}$ T230P-Mutation weniger transkribiert. Allerdings ist diese Beobachtung stark Medien-abhängig und war überwiegend in THB-Medium zu erkennen (Mascher *et al.*, 2003; diese Arbeit, Tab. 3.16).
Der molekulare Zusammenhang zwischen dem Cia-System und der Kompetenz ist nur fragmentarisch verstanden. So konnte von Sebert *et al.* (2005), Merai (2003) und in dieser Arbeit die Beteiligung des HtrA-Proteins an der Inhibierung der genetischen Kompetenz in der KP3-Mutante (Cia „ON“) nachgewiesen werden. Sebert *et al.* zeigten weiterhin, dass diese Inhibierung nicht durch Degradierung des CSP-Peptids, sondern über einen unbekannten Mechanismus verläuft. Allerdings konnten die Autoren diesen Effekt nur in CpH8- und nicht in THB-Medium nachweisen. Dieses deutet die Beteiligung weiterer Faktoren an der Repression der Kompetenz durch das Cia-System an. In dieser Arbeit konnte die Beteiligung des Spr0782-Proteins an dieser Repression als einer dieser weiteren Faktoren gezeigt werden. Die Inaktivierung von *spr0782* in dem KP3-Hintergrund führte zu einer Transformationseffizienz ähnlich der des Wildtyps (siehe Abb.3.14). Jedoch war dieser Effekt ebenfalls nur in CpH8- und nicht in THB-Medium zu beobachten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Kompetenz von *htrA*- und *spr0782*-Doppelmutanten. Möglicherweise sind beide Proteine an der Repression beteiligt, so dass eine gemeinsame Inaktivierung zu einer vollständigen Wiederherstellung der Kompetenz in der KP3-Mutante führen könnte.
Entgegen den ursprünglichen Erwartungen konnte kein Anstieg der Transkription der Kompetenzgene in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden, sondern eine stetige Reduktion von N10 – N130 (Tab. 3.11). Allerdings könnte der zeitliche Abstand der Messintervalle nicht eng genug gewesen sein, um einen plötzlichen Anstieg und Abfall der Transkription zu detektieren. Aber im Gegensatz zu den Kompetenzgenen war die Transkription des Cia-Regulons Wachstumsphasen-abhängig. Sie wurden in der exponentiellen Wachstumsphase weniger transkribiert. Diese Beobachtung könnte mit der Kompetenz zusammenhängen, da in diese Wachstumsphase der Anstieg der Kompetenzgene fallen sollte.
Die Kompetenz ist ein wichtiger Aspekt für die Evolution von *S. pneumoniae*. Durch Kompetenz wird horizontaler Gentransfer durch Aufnahme zellfremder DNA ermöglicht. Dies wiederum ist ein wichtiger Beitrag z.B. für die Ausbreitung von Resistenzen (Dowson *et al.*, 1989; Hakenbeck *et al.*, 2001). Ein aktiviertes Cia-System in resistenten klinischen Stämmen würde höhere Resistenzen über Gentransfer durch die fehlende Kompetenz verhindern. Deshalb finden sich wahrscheinlich keine CiaH-Mutationen in resistenten klinischen Isolaten.

### 4.1.5 Das Cia-System und Virulenz

*S. pneumoniae* ist ein bedeutender Krankheitserreger von *Homo sapiens*. Er ist die Hauptursache von einigen Krankheiten, wie z.B. der Lobärpneumonie und der Bronchopneumonie. Weitere Infekte sind die akute Exazerbation bei der chronischen Bronchitis, die Otitis media (Mittelohrentzündung), Sinusitiden (Nasennebenhöhlen-entzündung), die Menigitis (Hirnhautentzündung) und das Ulcus corneae (Hornhaut-entzündung). In mehreren Maus-Infektions-Modellen konnte das Cia-System als wichtiger Bestandteil der Pathogenität von *S. pneumoniae* beschrieben werden (Ibrahim *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2002; Throup *et al.*, 2000). Anscheinend ist es an dem epithelialen Zellkontakt beteiligt (Orihuela *et al.*, 2004). Von Ibrahim *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass das HtrA-Protein entscheidend an dem Beitrag des Cia-Systems zur Pathogenität beteiligt ist. In einer Cia-Deletionsmutante konnte durch Überexpression von HtrA die volle Virulenz wieder hergestellt werden. Da aber HtrA überexprimiert wurde, ist die quantitative Dimension des Beitrags von HtrA unklar. Weitere Cia-regulierte Gene könnten ebenfalls zur Virulenz beitragen.
Die *lic*-Gene sind für die Substitution der Teichonsäuren mit Cholin verantwortlich. Eine Reduktion der Cholinsubstitution der Zellwand führte bei einem Serotyp 2-Stamm zu einer Reduktion der Virulenz (Khorat und Tomasz, 2006). Die Ursache dieser Verringerung der Virulenz könnte die geringere positive Ladung der Zellwand oder die Abwesenheit von Bindestellen für die Cholinbindeproteine (CBPs) sein, da CBPs das Cholin in den Teichonsäuren als Verankerungspunkt für ihren Wirkungsort nutzen. Für viele der CPBs wird eine Beteiligung an der Virulenz nahegelegt (Swietlo *et al.*, 2004).
Die Inaktivierung von *manL* in *S. mutans* führte nicht nur zu einer geringeren Transkription von Virulenzfaktoren (Glykosyltransferasen), sondern auch zu einer veränderten Expression von mindestens 38 Proteinen (Abranches *et al.*, 2003). Ebenso können Zelloberflächenproteine durch die Inaktivierung von *manL* in ihrer Expression beeinflusst sein (Brochu *et al.*, 1993). Somit könnten die *man*-Gene einen Beitrag zu der Pathogenität von *S. pneumoniae* beitragen. Dieser wurde allerdings noch nicht genau untersucht.

## 4.2 Identifizierung von Cia-regulierten Genen

Der methodische Ansatz in dieser Arbeit zur Identifizierung von Cia-regulierten Genen basiert auf der DNA-Chiptechnologie. Diese ist in den Kapiteln 2.13 – 2.19 und 3.6 näher erläutert. Diese Methodik basiert auf der simultanen Messung von mRNA-Transkripten. Durch einen Vergleich mit einer Referenz kann die Veränderung an mRNA-Transkripten beurteilt werden. In dieser Arbeit wurde das Transkriptionsprofil von Cia „OFF“ (KP1), CiaH$^-$ (KP2) und Cia „ON“ (KP3) mit dem Wildtyp R6 verglichen, um Cia-regulierte Gene zu identifizieren. Zusätzlich wurde über Transkriptionsprofilvergleiche in den Transkriptionsanalysen mit spontanresistenten Labormutanten nach Genen gesucht, die sich ähnlich zu den Genen des minimalen Cia-Regulons verhielten und somit möglicherweise einen Hinweis auf eine Cia-Regulation darstellen.
Drei Arbeiten benutzten die Mikroarray-Technik (Sebert *et al.*, 2002; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) bzw. eine Kombination aus Solid Phase DNA Binding (SPDB) Assay und Mikroarray-Technik (Mascher *et al.*, 2003), um Cia-regulierte Gene zu identifizieren. Dabei fällt auf, dass in jeder Arbeit unterschiedliche Stämme und Chips verwendet wurden, die z.T. das Genom nicht vollständig abdeckten. Deshalb bestand die Notwendigkeit eine funktionstüchtige Mikroarray-Plattform zu etablieren, um möglichst vollständig Cia-regulierte Gene beschreiben zu können.
Ein qualitativer Vergleich der vier Analysen ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Hier sind alle Cia-regulierten Gene aus den Arbeiten von Sebert *et al.*, Mascher *et al.* und Dagkessamanskaia *et al.* mit den in dieser Arbeit identifizierten Genen aufgelistet. Es wurde analysiert, ob diese Gene in den hier vorgestellten Experimenten auch als Cia-reguliert identifiziert wurden. In allen vier Arbeiten wurden Stämme verwendet, die eine Genunterbrechung in dem *ciaR*-Gen hatten.
In diesem Vergleich (siehe Tabelle 4.1) sind neun Genloci (inklusive des Kompetenz-Operons), die in mindestens vier globalen Transkriptionsvergleichen als Cia-reguliert beschrieben wurden. Aus Tabelle 4.1 geht hervor, dass die globalen Transkriptionsanalysen von Mascher *et al.* und Dagkessamanskaia *et al.* überwiegend mit den in dieser Arbeit vorgestellten Genen übereinstimmen. Dabei sollte die Arbeit von Mascher *et al.* und die hier vorgestellte Arbeit die größte Übereinstimmung zeigen, da im Abstand von 5 Jahren die gleichen Stämme und auch die gleichen Medien für einige untersuchte Bedingungen verwendet wurden. Die Arbeit von Sebert *et al.* enthält 13 Gene oder Genloci, die in den anderen Arbeiten nicht als Cia-reguliert gefunden wurden. Auch der SPDB-Assay, welcher kein Transkriptionsassay ist, sondern mit welchem die direkte Bindung des CiaR-Proteins an DNA identifiziert werden kann, enthält zehn Genloci, die in keiner der vier Transkriptionsanalysen als Cia-reguliert aufgedeckt werden konnten.

**Tabelle 4.1: Globale Transkriptionsanalysen zur Identifizierung von Cia-regulierten Genen**

| Regulations-einheit | Gene (sofern bekannt) | Gennummer TIGR4 | Gennummer R6 | SPDB Assay | Sebert | Mascher KP1 | Mascher KP3 | Dagkessa manskaia | KP1 (Cia$^{OFF}$) | KP3 (Cia$^{ON}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *dnaA - dnaN* | *sp0001 - sp0002* | *spr0001 - spr0002* | - | | | | weniger | | |
| 2 | Glykosyltransferase | *sp0081* | *spr0073* | - | | | | | | |
| 3 | *sdhA* | *sp0105* | *spr0094* | - | weniger | | | | | |
| 4 | *epsG*, ABC-AB, Glykosyltransferase | *sp0133 - sp0137* | *spr0135 - spr0137* | + | | | | | | |
| 5 | *gpmB*, *pflE*, *deoR*, Eisen-Transporter | *sp0239 - sp0247* | *spr0218 - spr0228* | + | | | | | | |
| 6 | *ruvB*, *uppS*, hypothetisch | *sp0257 - sp0261* | *spr0237 - spr0240* | + | | | | | | |
| 7 | *manLMN* | *sp0282 - sp0284* | *spr0259 - spr0261* | + | | mehr | weniger | mehr | | |
| 8 | TCS03 | *sp0386 - sp0387* | *spr0343 - spr0344* | - | | | | weniger | mehr | gleich |
| 9 | Zellwandankerprotein | *sp0463* | | - | weniger | | | | | |
| 10 | Potassiumaufnahmeprotein | *sp0479* | *spr0426* | - | weniger | | | | | |
| 11 | *spiAB*, *blp*-cluster | *sp0524 - sp0533* | *spr0461 - spr0466* | + | | mehr | weniger | | mehr | weniger |
| 12 | PTS IIABC, Glukose-Unterfamilie | *sp0577* | *spr0505* | | mehr | | | | mehr | mehr |
| 13 | *estA*, *fibAB* (*murMN*), hypothetisch | *sp06114- sp0617* | *spr0539 - spr0542* | + | | | | | weniger[1] | mehr[1] |
| 14 | *pepN* | *sp0797* | *spr0706* | - | weniger | | | | | |
| 15 | *ciaRH* | *sp0798 - sp0799* | *spr0707 - spr0708* | - | weniger* | weniger* | mehr | weniger* | weniger* | mehr |
| 16 | *pyn*, *deoC*, *cdd*, *lipoprotein* | *sp0842 - sp0845* | *spr0744 - spr0747* | + | | | | | | |
| 17 | *parC* | *sp0855* | *spr0757* | - | weniger | | | | | |
| 18 | *spr0782* | *sp0879* | *spr0782* | - | | weniger | mehr | gleich | weniger | mehr |
| 19 | *spr0931* | *sp1027* | *spr0931* | - | weniger | weniger | mehr | weniger | weniger | mehr |
| 20 | *pitABCD* | *sp1032 - sp1035* | *spr0934 - spr0938* | + | | | | | | |
| 21 | hypothetisch | *sp1057 - sp1067* | upstream von *spr0973* | + | | | | | | |
| 22 | *truB* | *sp1212* | *spr1092* | - | | | | | | |
| 23 | *lic*-cluster | *sp1268 - sp1272* | *spr1145 - spr1149* | + | weniger | weniger | gleich | gleich | weniger | gleich |
| 24 | ABC-Transporter | *sp1357* | *spr1215* | - | | | | | | |
| 25 | hypoth./Pyridoxinbiosyntheseprotein | *sp1467 - sp1468* | *spr1321 - spr1322* | - | weniger | | | | | |
| 26 | *pgm*, *bta* | *sp1498 - sp1499* | *spr1351 - spr1352* | + | | | | | | |
| 27 | hypothetisch | *sp1546* | *spr1402* | - | weniger | | | | | |
| 28 | *dapB* | *sp1555* | *spr1414* | - | weniger | | | | | |
| 29 | Endoribonuklease | *sp1567* | *spr1425* | - | weniger | | | | | |
| 30 | *axe* | *sp1695* | *spr1538* | + | | weniger | mehr | weniger | gleich | mehr |
| 31 | hypothetisch | *sp1742* | *spr1587* | - | weniger | | | | | |
| 32 | Iojap-ähnliches Protein | *sp1744* | *spr1589* | - | weniger | | | | | |
| 33 | Glykosyltransferase | *sp1771* | | - | weniger | | | | | |
| 34 | ATPase | *sp1790* | *spr1616* | - | weniger | | | | | |
| 35 | *sacA* | downstream von *sp1795* | downstream von *spr1617* | + | | | | | | |
| 36 | *cyl*-Locus | *sp1945 - sp1954* | *spr1762 - spr1771* | + | | weniger | gleich | weniger | mehr** | gleich |
| 37 | hypothetisch, 23 S rRNA | *sp2002 - sp2005* | *spr1816 - spr1818* | + | | | | | | |
| 38 | *malPM* | *sp2106 - sp2107* | *spr1916 - spr1917* | + | weniger | weniger | mehr | weniger | weniger | mehr |
| 39 | *dltABCD* | *sp2173 - sp2176* | *spr1979 - spr1982* | + | | weniger | mehr | weniger | weniger | mehr |
| 40 | *htrA*, *spo0J* | *sp2239 - sp2240* | *spr2045 - spr2046* | + | weniger | weniger | mehr | weniger | weniger | mehr |
| | Kompetenzgene | | | | mehr | mehr | weniger | *** | mehr | weniger |

Dargestellt sind die Ergebnisse der globalen Transkriptionsanalysen von Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004). Dazu wurden die Ergebnisse des Solid Phase DNA Binding (SPDB)-Assay und der in dieser Arbeit vorgestellten Transkriptionsanalysen verglichen. „Mehr“ und „weniger“ deuten die Transkription in der Mutante im Vergleich zu der im Wildtyp R6 an. Bei Sebert *et al.* und Dakessamanskaia *et al.* wurden KP1-ähnliche Mutanten benutzt. Die Spalten KP1 und KP3 stellen die Ergebnisse aus der hier vorgestellten Arbeit dar. [1]bezieht sich nur auf das *spr0542*-Gen (ohne bekannte Funktion). *Da das *ciaR*-Gen inaktiviert wurde, kann es nicht mehr transkribiert werden. **bezieht sich nur auf das *spr1762*-Gen. ***Es wurde eine *comC*$^{null}$-Mutante benutzt, die keine Kompetenz mehr entwickelt.

Die in Tabelle 4.1 farbig unterlegten Gene entsprechen überwiegend den Genen aus Tabelle 1.1, welche in dieser Arbeit als minimales Cia-Regulon zusammengefasst wurden. Das *blp*-Operon und die *cyl*-Region wurden dem Kompetenz-Regulon zugeordnet, da sie von Peterson *et al.* (2004) als CSP induziert beschrieben wurden, und sind deshalb in Tabelle 3.16 im Kapitel 3.7.2 zu finden. Die Gene, welche nicht zum minimalen Cia-Regulon gruppiert wurden, wurden auch in dieser Arbeit mit Ausnahme von *spr0505* und *spr0542* nicht 2-fach unterschiedlich transkribiert. Die Ergebnisse des SPDB-Assays stellen einen Sonderfall dar, da mit dieser Technik die Bindung des CiaR-Proteins an DNA untersucht wird und so auch genetische Elemente identifiziert werden können, die nicht auf einem Chip enthalten sind (z.B. Elemente die nicht annotiert sind, sRNA).
Das *htrA*-Gen wurde am stärksten durch das Cia-System reguliert. Dieser Unterschied war größer als bei dem *ciaR*-Gen, welches durch die Inaktivierung in der KP1-Mutante nicht mehr transkribiert werden kann. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die *htrA*-Transkription fast ausschließlich an ein funktionelles Cia-System gebunden ist. Dies schließt aber eine Regulation von *htrA* durch andere Systeme nicht aus.
Von den 158 Genen, die in Kapitel 3.7.2 als Cia-reguliert beschrieben wurden, konnten 73 Gene bereits durch die anderen Arbeiten bestätigt werden. 85 der vorgestellten Gene wurden bislang noch nicht als Cia-reguliert beobachtet.
Von den 26 in den Tabellen 3.17 und 3.18 aufgelisteten Genen, deren Produkte Zucker metabolisieren, wurde nur *spr0505* bisher von Sebert *et al.* als Cia-reguliert beschrieben. Da die *man*- und die *mal*-Gene in den Zuckerkatabolismus eingreifen und der Kohlenhydratmetabolismus stark vernetzt ist, ist es erstaunlich, dass keine anderen Zuckerverwertungsgene bisher beschrieben wurden. Dies ist umso überraschender, da z.T. die Zuckerverwertungsgene sehr stark unterschiedlich transkribiert wurden (siehe Tabelle 3.18). Bei Sebert *et al.* sind neben dem *malP*-Gen, welches für eine Maltodextrin Phosphorylase kodiert, noch ein PTSII-Gen (*spr0505*) und zwei Glykosyltransferasen (*spr0073* und *sp1771*) aufgetreten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass nicht alle Zuckerverwertungsgene direkt durch das Cia-System reguliert werden, sondern dass durch die Regulation einzelner Gene die gesamte Zuckerverwertung stark moduliert wird. Für das *manL*-Genprodukt, $EIIAB^{man}$, welches die cytoplasmatischen Proteine des Mannose-PTS darstellt, konnte eine globale Funktion auf das Wachstum, die Katabolitrepression und die Zelloberfläche gezeigt werden (Chaillou *et al.*, 2001; Veyrat *et al.*, 1994; Abranches *et al.*, 2003; Bourassa und Vadeboncoeur, 1992). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass $EIIAB^{man}$ ein Effektor der „Carbon Catabolite Repression“ (CCR) sein könnte. Wie $EIIAB^{man}$ die CCR beeinflusst, ist unklar. Mögliche Erklärungen könnten die Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen oder die direkte Interaktion mit Zuckerpermeasen sein. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein mögliches Katabolit Response Element (cre), welches 60 bp upstream des *manL* Startkodons in *S. pneumoniae* liegt. Cre ist eine konservierte DNA Sequenz, an die der CcpA-HPr-Komplex bindet und eine effektive Katabolitrepression durchführt. Die konservierte Sequenz vor dem *manL*-Gen variiert um 2 Basen von der Konsensussequenz (Konsensussequenz = TGWNANCGNTNWCA (Weickert und Chambliss, 1990); 60 bp vor *manL* = TGAAAACGGTTTAT). Wenn diese Sequenz eine funktionelle cre-Bindestelle darstellt, dann ist das $EII^{man}$-Operon unter der Kontrolle des CCR über den CcpA-Weg. In dieser Konstellation könnte CcpA als Masterregulator des CCR dienen und das $EIIAB^{man}$-Protein zur Feinregulation benutzt werden. Der Einfluss von ManL an der Regulation des CCR könnte somit eine Erklärung für eine indirekte Regulation der anderen Zuckerverwertungsgene sein.
Die Genprodukte aus Tabelle 3.21 sind am Metabolismus von Stickstoff beteiligt. Die Cia-abhängige Transkription dieser Gengruppe lässt sich möglicherweise auch über die Zuckerverwertungsgene erklären. Denn eine veränderte Transkription von einigen Zuckerverwertungsgenen (z.B. *man*-Gene) kann zu einer Katabolitrepression führen, da

einige Zucker nicht mehr in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden sind. Die Katabolitrepression wird durch das CcpA ausgeführt. In Folge der Aktivierung des CcpA-Proteins werden nicht nur Gene des Zuckermetabolismus, sondern auch des Stickstoffmetabolismus reguliert (Faires *et al.*, 1999; Wacker *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2001; Blencke *et al.*, 2006; Choi und Saier, 2005; Chen *et al.*, 1998). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass durch Transkriptionsänderung von Zuckerverwertungsgenen auch Gene des Stickstoff-Metabolismus in ihrer Transkription verändert sind. Aber es gibt keinen Hinweis, warum ausgerechnet die 14 Gene aus Tab. 3.21 als Cia-reguliert aufgetreten sind.
Die dritte Gruppe der Cia-regulierten Gene sind die ABC-Transporter (siehe Tabelle 3.19). Diese lassen sich in verschiedene Familien gruppieren und transportieren wahrscheinlich Zucker, Aminosäuren, Kupfer und Peptide und exportieren Antibiotika und Peptide. Es erscheint nachvollziehbar, dass durch Veränderung des metabolischen Flusses auch die Ausstattung an entsprechenden Transportproteinen angepasst sein muss. In der Arbeit von Moreno *et al.* (2001) konnte auch die Abhängigkeit der Transkription von einigen nicht Zucker-spezifischen Transportproteinen von einem intakten CcpA nachgewiesen werden.
Die *man*-Gene wurden in dieser Arbeit nur im Vergleich mit der KP3-Mutante (Cia „ON“) 1,4 – 1,9-fach unterschiedlich transkribiert (siehe Tabelle 3.15). Bei Mascher *et al.* wurden die *man*-Gene z.T. 2 – 3-fach, bei Dagkessamanskaia *et al.* 2-fach unterschiedlich transkribiert. Da die *man*-Gene in der hier vorgestellten Arbeit nicht stärker unterschiedlich transkribiert wurden als bei Mascher *et al.* oder bei Dagkessamanskaia *et al.*, ist nicht klar, warum nur in dieser Arbeit eine so starke Regulation von Folgegenen der Katabolitrepression aufgetreten ist.
Die 85 Gene, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit dem Cia-System aufgetreten sind, sind wahrscheinlich nicht direkt durch das Cia-System reguliert, da unter diesen 85 Genen viele Gene der Katabolitrepression sowie einige weitere Regulatoren sind. Die Gene der Katabolitrepression könnten eine Folge der direkten Regulation durch die *man*- (und evtl. auch der *mal*-) Gene sein. Die Regulatoren, die wahrscheinlich nicht in den Kohlenstoff- oder Stickstoff-Metabolismus eingreifen und Cia-abhängig transkribiert wurden, sind *spr1874*, ein Regulator der MarR-Familie, und *spr0344*, der Responseregulator des TCS03. Welche Gene durch diese Regulatoren reguliert und damit Cia-unabhängig transkribiert wurden, ist unklar. Aber es erscheint sinnvoll anzunehmen, dass einige der hier als Cia-abhängig transkribierten Gene, durch diese Regulatoren und nicht durch das Cia-System reguliert wurden.
Ein erster Hinweis auf eine direkte Regulation könnte ein ähnliches Transkriptionsmuster wie das des minimalen Cia-Regulons sein, für welches z.T. eine direkte Regulation nachgewiesen werden konnte (Merai, 2003; Halfmann, 2004). In dieser Hinsicht sind nur die *spr0276 – spr0282* und die *spr1289 – spr1293* gefunden worden. Das erste Operon, ein Cellobiose-Verwertungssystem inklusive PTS-System (KIlic *et al.*, 2004), zeigte eine sehr starke Cia-abhängige Transkription mit z.T. 10-fachen Unterschieden. Das zweite Operon kodiert für ABC-Tranporter und wurde nicht zu allen untersuchten Bedingungen Cia-abhängig transkribiert, erreichte aber auch z.T. 5-fache Transkriptionsunterschiede.
Ein weiterer Hinweis auf eine direkte Cia-Regulation ist die Identifizierung einer CiaR-Bindestelle vor einem Gen (Zähner, 1999; Mascher, 2001; Merai, 2003; Halfmann, 2004). Allerdings konnte vor den hier vorgestellten neuen Cia-regulierten Genen keine stringente CiaR-Bindestelle gefunden werden.

Zur Identifizierung von weiteren Cia-regulierten Genen zusätzlich zu dem bekannten Cia-Regulon wurde auch nach Genen gesucht, deren Transkriptionsmuster in der C003-Mutantenfamilie mit der des minimalen Cia-Regulons ähnlich war (siehe Kapitel 3.8, Tab. 3.26). Die meisten Gene des minimalen Cia-Regulons wurden von C103 bis C503 kontinuierlich aktiviert. Die *man*-Gene wurden kontinuierlich reprimiert. Eine Suche nach beiden Transkriptionsmustern lieferte jedoch nur den *spr0276 – spr0282*-Genlocus, welcher

ein dem Cia-Regulon ähnliches Transkriptionsmuster aufwies. Die Gene dieses Operons wurden, ähnlich wie einige Gene des minimalen Cia-Regulons, bis 16-fach in C503 aktiviert. Ein ähnlicher Ansatz wurde gewählt, um über die R6-Wachstumskurve dem Cia-Regulon ähnlich transkribierte Gene zu finden. Dieser Ansatz brachte aber keine aussagekräftigen Ergebnisse. Möglicherweise überdeckten sowohl in der C003-Mutantenfamilie als auch in der R6-Wachstumskurve sekundäre Effekte die potentielle Cia-Regulation, so dass über einen einfachen Transkriptionsmuster-Homologie-Vergleich nur wenige Resultate erzielt werden können. Jedoch erscheint nur der *spr0276 – spr0282*-Genlocus aufgrund der starken Cia-abhängigen Transkription und der Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile ein geeigneter Kandidat für eine direkte Cia-Regulation. Um dies zu klären, sind fortführende Experimente, z.B. Transkriptionsstartbestimmungen sowie Gelretardierungs-Experimente, notwendig.

## 4.4 Die Vernetzung des Cia-Systems mit anderen Signaltransduktionswegen in *S. pneumoniae*

Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen Transmitterdomänen der Histidinkinasen und Receiverdomänen der Responseregulatoren setzt die Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) der Gefahr von unspezifischen Kreuzreaktionen aus. Diese Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Zwei-Komponenten-Systemen wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen *in vitro* (Ninfa *et al.*, 1988; Wanner, 1992; Fischer *et al.*, 1996) und *in vivo* (Kim *et al.*, 1996; Matsubara und Mizuno, 1999; McCleary *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1998) gefunden. Diese als „Cross-talk“ bezeichnete Interaktion ist von Kreuzregulation zu unterscheiden. Kreuzregulation beinhaltet die in Abb. 4.2 aufgezeigten Vernetzungen Signalamplifikation und Signalintegration. Die Phosphotransferrate zwischen nicht-kognaten Partnern wurde um zwei Größenordnungen kleiner eingeschätzt, als zwischen kognaten Partnern (Fischer *et al.*, 1996). Trotzdem wird die Vernetzung von Signaltransduktionswegen immer wieder diskutiert (Hellingwerf *et al.*, 1995, 1998; Verhamme *et al.*, 2002; Perraud *et al.*, 1999).

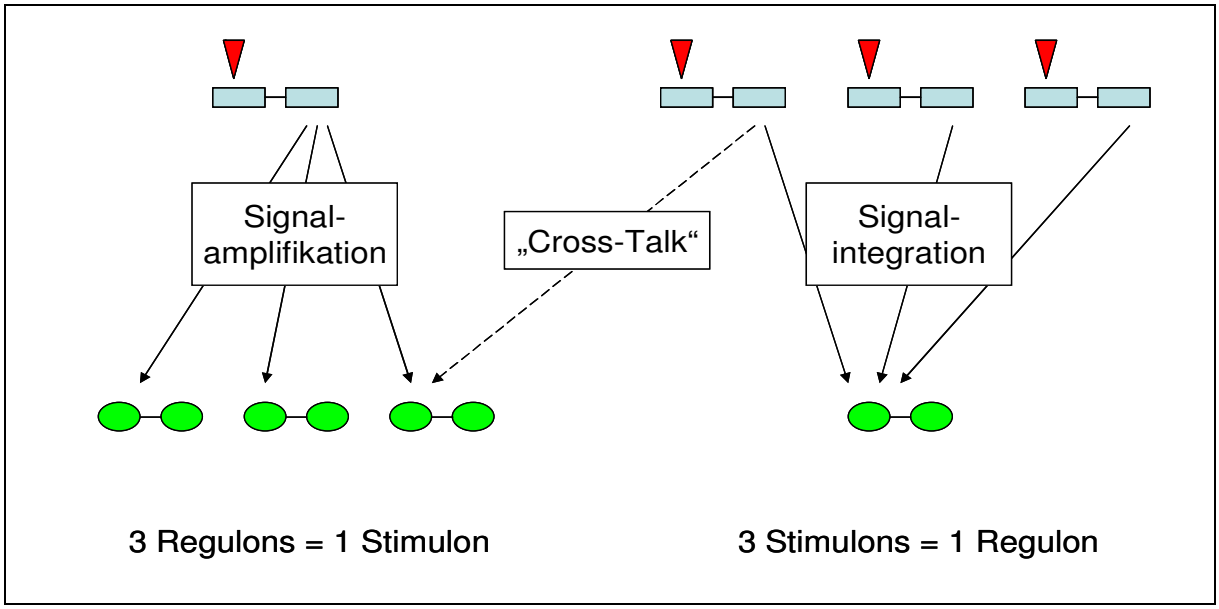



**Abb. 4.2: Modell zur Vernetzung von Signaltransduktionswegen**
Dargestellt sind vier Zwei-Komponenten-Systeme sowie drei Möglichkeiten der Vernetzung zwischen den einzelnen Zwei-Komponenten-Systemen. Hellblau quadratisch sind die HK, grün rund die RR. Das rote Dreieick stellt das Signal für die HK dar. Bei einem klassischen Zwei-Komponenten-System ist ein Stimulon gleich ein Regulon.

In *S. pneumoniae* wurden 13 Zwei-Komponenten-Systeme und ein einzelner Response-regulator identifiziert (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde die Vernetzung des Cia-Systems mit den anderen zwölf Zwei-Komponenten-Systemen untersucht. Dabei ist eine Interaktion zwischen dem Cia- und dem ComCDE-System schon länger bekannt, da das Cia-System die Kompetenz beeinflusst. Es wurde in dieser Arbeit eine mögliche Vernetzung des Cia-Systems mit dem TCS 03 und dem TCS 13 beobachtet. Bei Abwesenheit von CiaH und HK03 oder HK13 wurden Cia „OFF"-ähnliche Phänotypen (z.B. hohe Vancomycin-Empfindlichkeit) identifiziert. Neben diesen phänotypischen Beobachtungen wurden beide TCS Cia-abhängig transkribiert (siehe Tab. 3.15 und Tab. 6.3 im Anhang). So zeigten die TCS03-Gene eine erhöhte Transkription (Faktor 2) zu N10 – N40 bei Abwesenheit des Cia-System in CpH8-Medium. Das Gen für den RR13 wurde ca. 2-fach mehr bei Abwesenheit und ca. 2-fach weniger durch die Aktivierung des Cia-Systems transkribiert. Die Vernetzung zwischen dem Cia-System und dem TCS03 erscheint ausgeprägter, da es noch weitere Hinweise für diese Vernetzung gibt. So wurde die Cia-abhängige Transkription der TCS03-Gene schon von Dagkessamanskaia *et al.* (2004) beschrieben und Haas *et al.* (2005) konnten die Induktion der Transkription der Gene beider Systeme durch Vancomycin feststellen.
Es wurde berichtet, dass die HK03 signifikante Ähnlichkeit von 38% Identität und 63% Ähnlichkeit zu LiaS aus *B. subtilis* aufweist (Haas *et al.*, 2005). Das Zwei-Komponenten-System LiaRS wird durch Behandlung mit Vancomycin und Bacitracin in *B. subtilis* aktiviert (Mascher *et al.*, 2003; Mascher *et al.*, 2004). Die Ähnlichkeit von HK03 mit LiaS besteht allerdings nur für die C-terminale HK-Domäne (AS 137 – AS 331) und nicht für das gesamte Protein, wie von Haas *et al.* behauptet. Für die Sensordomäne wurde keine Ähnlichkeit gefunden. Demnach kann aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht von einer ähnlichen Funktion des Cia- und des Lia-Systems ausgegangen werden.
Wie diese Vernetzungen stattfinden, ist bislang unklar. Allerdings konnten auch einige Vernetzungen zwischen TCS gefunden werden, die nicht auf Kreuzregulation oder Crosstalk beruhen. Knutsen *et al.* (2004) berichten von einer Regulation desselben Gens durch zwei TCS (ComDE und BlpRH) in *S. pneumoniae*, die sich ein Hybrid-Direkt-Repeat-Motiv teilen. Howell *et al.* (2006) demonstrieren die Vernetzung des YycFG und des PhoPR-Systems über Phosphorylierung von YycF durch PhoR und die Bindung von YycF an den *phoPR*-Promotor.

Diese Beobachtungen und Überlegungen müssten in weiteren Experimenten überprüft werden. So könnten in *in vitro* Phosphorylierungsassays mögliche Kreuz-Phosphorylierungen identifiziert werden. Möglichweise lassen sich mit Transkriptionsstudien von verschiedenen TCS03- oder TCS13-Mutanten die Vernetzungen zum Cia-System weiter charakterisieren.

## 4.5 Das Cia-System – eine Zusammenfassung

Das Cia-System war seit seiner Entdeckung Ziel intensiver Forschungsbemühungen. So wurden nicht nur die zuerst beschriebenen Auswirkungen auf die Resistenz und die Kompetenz, sondern auch auf die Lyse und die Virulenz beobachtet. Insgesamt ergibt sich ein pleiotroper Phänotyp, welcher durch Mutationen im Cia-System verursacht werden kann. Da das Cia-System ein Zwei-Komponenten-System ist und damit ein regulatorisches Element der Zelle zur Transkriptionssteuerung von Zielgenen darstellt, muss der pleiotrope Phänotyp durch die Zielgene verursacht werden. Eine Zusammenfassung der Gene des minimalen Cia-Regulons und der hier identifizierten Zielgene sind in Abb. 4.3 wiedergegeben. HtrA, Spr0782 und noch unbekannte Faktoren konnten für den Kompetenz-Phänotyp verantwortlich gemacht werden. HtrA und wahrscheinlich die *dlt*- und die *lic*-Gene verursachen den Virulenz-Phänotyp. Die Lyse kann möglicherweise mit der Kompetenz zusammenhängen und ist ansonsten – wie die Resistenz auch – noch unverstanden. Wie die bisher identifizierten Verknüpfungen auf molekularer Ebene ablaufen, ist völlig unklar und bedarf intensivster Forschungsarbeit um das Cia-System auf molekularer Ebene zu verstehen. Das äußere Signal für das Cia-System konnte noch nicht identifiziert werden. Jedoch wird das Cia-System wahrscheinlich durch Zellwandstress aktiviert. Anhand von verschiedenen PBP-Mutationen und durch Behandlung von Zellwand-schädigenden Substanzen konnte dieser Zellwandstress simuliert und eine Aktivierung des Cia-Systems gezeigt werden.

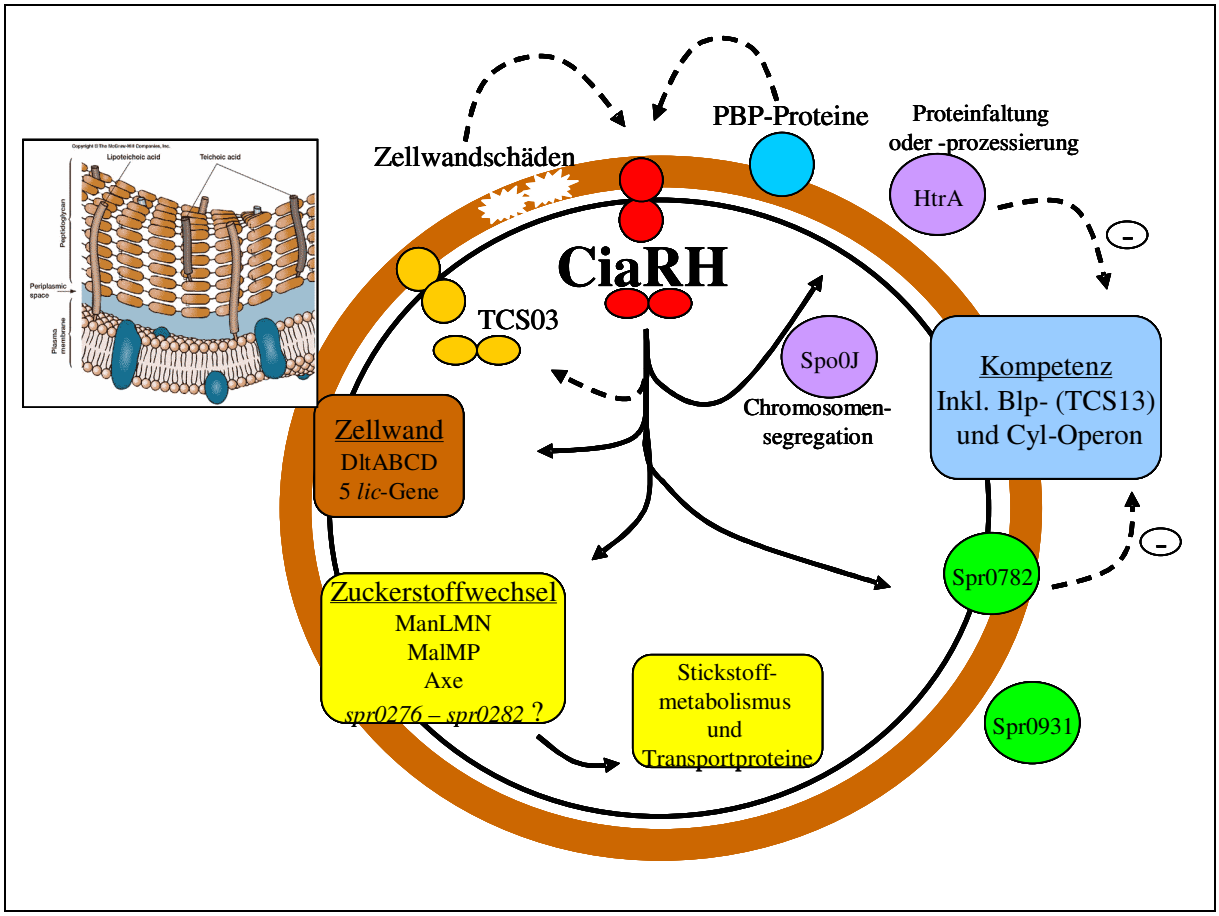



**Abb. 4.3: Das Cia-System und seine Zielgene**
Dargestellt sind die möglichen Zielgene des Cia-Systems sowie deren Lokalisation und Funktion. „-„ deutet eine negative Regulation an. Die durchgezogenen Pfeile, die vom Cia-System fortgehen, repräsentieren eine mögliche direkte Regulation. Die gestrichelten Pfeile zeigen unbekannte Regulationswege.

## 4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Notwendigkeit eines funktionellen bzw. aktivierten Cia-Systems phänotypisch unter Zellwandstress untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass verschiedene PBP-Mutationen unterschiedliche Auswirkungen und unterschiedliche Bedürftigkeit für ein funktionelles Cia-System haben. Wie eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen CiaH und PBP-Proteinen stattfindet, müssen Folgeexperimente klären. Proteininteraktionsstudien mit der extracytoplasmatischen Domäne von CiaH könnten eine mögliche Interaktion oder einen Liganden von CiaH aufdecken. Andererseits lässt sich das Cia-System aber auch als Detektionssystem für die Auswirkungen von PBP-Mutationen verstehen. Damit könnten PBP-Mutationen in einem $Cia^-$-Hintergrund klassifiziert werden.
Die Beteiligung der Proteine Spr0782 und HtrA an der Reprimierung der Kompetenz durch das Cia-System wurde in dieser Arbeit gezeigt. Diese Reprimierung konnte allerdings nur in CpH8-Medium und nicht in THB-Medium nachgewiesen werden. Durch eine gemeinsame Inaktivierung beider Gene könnte eine vollständige Reprimierung erreicht werden. Es konnte kein Gen für die Cia-vermittelten Effekte der Resistenz oder der verstärkten Lyse verantwortlich gemacht werden. Die Inaktivierung von weiteren Cia-regulierten Genen, möglicherweise mit weiteren Faktoren zusammen, könnte dazu beitragen, die Effektoren dieser Cia-vermittelten Phänotypen zu identifizieren und den Beitrag dieser Effektoren festzustellen.
Durch Inaktivierung von CiaH mit weiteren Histidinkinasen wurde eine mögliche Vernetzung des Cia-Systems mit dem TCS03 und dem TCS13 beobachtet. Dieser Hinweis muss in Folgeexperimenten wie z.B. *in vitro* Phosphorylierungsassays oder Proteininteraktionsstudien bewiesen werden.
Die Mikroarray-Technik wurde in dieser Arbeit etabliert und zur Identifizierung von Cia-regulierten Genen benutzt. Dabei wurden unterschiedliche Bedingungen (z.B. Zelldichte, Medium, Mutanten) variiert, um möglichst viele Gene des Cia-Regulons zu identifizieren. Möglicherweise sind unter den hier vorgestellten Cia-regulierten Genen auch diejenigen, die die Cia-vermittelten Phänotypen verursachen. Die in dieser Arbeit beschriebene starke Regulation der *spr0276 – spr0282*-Gene könnte ein Hinweis auf eine direkte Regulation darstellen. Eine ausführliche Charakterisierung dieses Operons sowie CiaR-Bindungsstudien an den Promotor dieser Gene könnte eine mögliche direkte Cia-Regulation klären. Weiterhin könnte die Mikroarray-Technik dazu dienen, das TCS03 bzw. das TCS13 näher zu charakterisieren. Vielleicht kann so eine Verknüpfung der TCS-Systeme bestätigt werden.
Viele der in dieser Arbeit vorgestellten Daten können als Basis für vielversprechende Folgeexperimente dienen und tragen hoffentlich zum Verständnis des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH bei.

# 5. Literaturverzeichnis

**Aaberge, I. S., Eng, J., Lermark, G. & Lovik, M. (1995).** Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Pathog.* **18**, 141-152.

**Abranches, J., Chen, Y. Y. & Burne, R. A. (2003).** Characterization of *Streptococcus mutans* strains deficient in EIIAB Man of the sugar phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 4760-4769.

**Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S. & Mizuno, T. (1989).** Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**, 14090-14094.

**Aleadini, A. & Day, R.A. (1999).** Identification of two-penicillin-binding multienzyme complexes in *Haemophilus influenzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 191-195.

**Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (1999).** The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**, 410-413.

**Alex, L. A. & Simon, M. I. (1994).** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* **10**, 133-138.

**Alloing, G., Martin, B., Granadel, C. & Claverys, J. P. (1998).** Development of competence in *Streptococcus pneumonaie*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol* **29**, 75-83.

**Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H. & Nakata, A. (1990).** Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol.* **172**, 6300-6307.

**Anthony, R. S. & Spector, L. B. (1972).** Phosphorylated acetate kinase. Its isolation and reactivity. *J Biol Chem.* **247**, 2120-2125.

**Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., Weiss, R. L. & Ninfa, A. J. (1994).** Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J Biol Chem* **269**, 28288-28293.

**Austrian R. (2000).** The enduring pneumococcus : unfinished business and opportunities for the future. In *Streptococcus pneumoniae* (ed. A. Tomasz), Mary Ann Liebert, Larchmont, USA.

**Avery O.T., MacLeod C. M. & McCarthy M. (1944).** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137-158.

**Barbosa, T. M. & Levy, S. B. (2000).** Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol.* **182**, 3467-3474.

**Barcus, V. A., Ghanekar, K., Yeo, M., Coffey, T. J. & Dowson, C. G. (1995).** Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 299-303.

**Bartilson, M., Marra, A., Christine, J., Asundi, J. S., Schneider, W. P. & Hromockyj, A. E. (2001).** Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol Microbiol* **39**, 126-135.

**Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995).** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B.* **57**, 289 - 300.

**Bergmann, C. (2003).** Epidemiologie eines Mosaikgens: *pbp2x* in β-Lactam-sensitiven und –resistenten oralen Streptokokken aus Spanien. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreulx, D., Chippaux, M. & Denizot, F. (2005).** BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem.* **280**, 28852-28857.

**Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. (1999).** Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131-141.

**Blencke, H. M., Reif, I., Commichau, F. M., Detsch, C., Wacker, I., Ludwig, H. & Stulke, J. (2006).** Regulation of citB expression in *Bacillus subtilis*: integration of multiple metabolic signals in the citrate pool and by the general nitrogen regulatory system. *Arch Microbiol.* **185**, 136-146.

**Borkovich, K. A. & Simon, M. I. (1990).** The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell* **63**, 1339-1348.

**Bourassa, S. & Vadeboncoeur, C. (1992).** Expression of an inducible enzyme II fructose and activation of a cryptic enzyme II glucose in glucose-grown cells of spontaneous mutants of *Streptococcus salivarius* lacking the low-molecular-mass form of IIIman, a component of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system. *J Gen Microbiol.* **138**, 769-777.

**Bowtell, D. & Sambrook, J. (2003).** (eds.) DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J. & Bush, K. (1997).** Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 563-569.

**Briese, T. & Hakenbeck, R. (1985).** Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem.* **146**, 417-427.

**Brochu, D., Trahan, L., Jacques, M., Lavoie, M. L., Frenette, M. & Vadeboncoeur, C. (1993).** Alterations in the cellular envelope of spontaneous IIILMan-defective mutants of *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol* **139**, 1291-1300.

**Brown J.H. (1919).** The use of blood agar for the study of streptococci. Monograph No.9, The Rockefeller Institute for Medical Research, New York, USA.

**Brown, J. M. & Firtel, R. A. (1998).** Phosphorelay signalling: new tricks for an ancient pathway. *Curr Biol* **8**, R662-665.

**Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Weber, B. & Hakenbeck, R. (2004).** Mosaic genes and mosaic chromosomes-genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol.* **294**, 157-168.

**Busch, W. & Saier, M. H., Jr. (2002).** The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **37**, 287-337.

**Campbell, E. A., Choi, S. Y. & Masure, H. R. (1998).** A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol* **27**, 929-939.

**Cao, V. T., Arlet, G., Ericsson, B. M., Tammelin, A., Courvalin, P. & Lambert, T. (2000).** Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* **46**, 895-900.

**Cash, P., Argo, E., Ford, L., Lawrie, L. & McKenzie, H. (1999).** A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* **20**, 2259-2268.

**Chaillou, S., Postma, P. W. & Pouwels, P. H. (2001).** Contribution of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*. *Microbiology.* **147**, 671-679.

**Chalker, A. F., Ingraham, K. A., Lunsford, R. D., Bryant, A. P., Bryant, J., Wallis, N. G., Broskey, J. P., Pearson, S. C. & Holmes, D. J. (2000).** The bacA gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence. *Microbiology.* **146**, 1547-1553.

**Chalker, A. F., Minehart, H. W., Hughes, N. J., Koretke, K. K., Lonetto, M. A., Brinkman, K. K., Warren, P. V., Lupas, A., Stanhope, M. J., Brown, J. R. & Hoffman, P. S. (2001).** Systematic identification of selective essential genes in *Helicobacter pylori* by genome prioritization and allelic replacement mutagenesis. *J Bacteriol.* **183**, 1259-1268.

**Chen, J. D. & Morrison, D. A. (1987).** Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**, 1959-1967.

**Chen, Y. Y., Hall, T. H. & Burne, R. A. (1998).** *Streptococcus salivarius* urease expression: involvement of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *FEMS Microbiol Lett.* **165**, 117-122.

**Chi, F. (2004).** The Role of Viridans Streptococci in the Evolution of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Genetic Relationships, Mosaic PBP1a Genes and the Price of Resistance. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Choi, S. K. & Saier, M. H., Jr. (2005).** Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *J Bacteriol.* **187**, 6856-6861.

**Clark, R. A. (1986).** Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils. *J Immunol.* **136**, 4617-4622.

**Claverys, J. P. & Havarstein, L. S. (2002).** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**, d1798-1814.

**Claverys, J. P. & Martin, B. (1998).** Competence regulons, genomics and streptococci. *Mol Microbiol* **29**, 1126-1127.

**Coffey, T. J., Daniels, M., McDougal, L. K., Dowson, C. G., Tenover, F. C. & Spratt, B. G. (1995).** Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 1306-1313.

**Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., Gotz, F., Neumeister, B. & Peschel, A. (2002).** *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis*. **186**, 214-219.

**Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997).** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10**, 673-676.

**Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J. & Claverys, J. P. (2004).** Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol* **51**, 1071-1086.

**de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E. & Lange, R. (2000).** Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol.* **182**, 4696-4703.

**Delgado, J., Forst, S., Harlocker, S. & Inouye, M. (1993).** Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for ompF and ompC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **10**, 1037-1047.

**Dintilhac, A. & Claverys, J. P. (1997).** The adc locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Res Microbiol* **148**, 119-131.

**Dowson, C. G., Barcus, V., King, S., Pickerill, P., Whatmore, A. & Yeo, M. (1997).** Horizontal gene transfer and the evolution of resistance and virulence determinants in Streptococcus. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**, 42S-51S.

**Dowson, C. G., Hutchison, A., Brannigan, J. A., George, R. C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J. M. & Spratt, B. G. (1989).** Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8842-8846.

**Dubnau, D. (1999).** DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**, 217-244.

**Dudoit, S., Yang, Y.H., Speed, T.P. & Callow, M.J. (2002).** Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**, 111 – 139.

**Dunny, G. M., Lee, L. N. & LeBlanc, D. J. (1991).** Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **57**, 1194-1201.

**Dutta, R. & Inouye, M. (2000).** GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci.* **25**, 24-28.

**Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S. & Trombe, M. C. (2000).** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of ciaRH and comCDE. *Mol Microbiol* **36**, 688-696.

**Eguchi, Y. & Utsumi, R. (2005).** A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem Sci.* **30**, 70-72.

**El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D. & Mengin-Lecreulx, D. (2004).** The bacA gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem.* **279**, 30106-30113 Epub 32004 May 30111.

**Evers, S. & Courvalin, P. (1996).** Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* **178**, 1302-1309.

**Faires, N., Tobisch, S., Bachem, S., Martin-Verstraete, I., Hecker, M. & Stulke, J. (1999).** The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**, 141-148.

**Fassler, J. S., Gray, W. M., Malone, C. L., Tao, W., Lin, H. & Deschenes, R. J. (1997).** Activated alleles of yeast SLN1 increase Mcm1-dependent reporter gene expression and diminish signaling through the Hog1 osmosensing pathway. *J Biol Chem.* **272**, 13365-13371.

**Fermer, C. & Swedberg, G. (1997).** Adaptation to sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**, 831-837.

**Fischer, C., Geourjon, C., Bourson, C. & Deutscher, J. (1996).** Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* prkA gene encoding a novel serine protein kinase. *Gene.* **168**, 55-60.

**Fisher, J. F., Meroueh, S. O. & Mobashery, S. (2005).** Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* **105**, 395-424.

**Fouseca, A. P., Extremina, C., Fouseca, A. F. & Sousa, J. C. (2004).** Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* **53**, 903-910

**Franklin T.J. & Snow G.A. (1989).** Biochemistry of antimicrobial action, 4th ed., Chapman and Hall, London, Great Britain.

**Garcia, J. L., Diaz, E., Romero, A. & Garcia, P. (1994).** Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol.* **176**, 4066-4072.

**Garcia, P., Garcia, J. L., Garcia, E. & Lopez, R. (1986).** Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43**, 265-272.

**Ghuysen, J. M. (1991).** Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**, 37-67.

**Giammarinaro, P., Sicard, M. & Gasc, A. M. (1999).** Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145**, 1859-1869.

**Gilmore, M. S. & Haas, W. (2005).** The selective advantage of microbial fratricide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 8401-8402.

**Gosink, K. And Tuomanen E. (2000).** *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. In gram-positive Pathogens (ed V.A. Fischetti), ASM press, Washington, USA.

**Grebe, T. & Hakenbeck, R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 829-834.

**Grebe, T., Paik, J. & Hakenbeck, R. (1997).** A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J Bacteriol* **179**, 3342-3349.

**Grebe, T. W. & Stock, J. B. (1999).** The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**, 139-227.

**Griffith, F. (1928).** The significance of pneumococcus types. *J. Hyg.* **27**, 113-159.

**Guenzi, E., Gasc, A. M., Sicard, M. A. & Hakenbeck, R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**, 505-515.

**Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B. & Claverys, J. P. (2005).** Competence-programmed predation of non-competent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8710-8715.

**Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C. & Tuomanen, E. I. (2005).** Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **187**, 8205-8210.

**Haas, W., Sublett, J., Kaushal, D. & Tuomanen, E. I. (2004).** Revising the role of the pneumococcal vex-vncRS locus in vancomycin tolerance. *J Bacteriol* **186**, 8463-8471.

**Hakenbeck, R., Briese, T., Ellerbrock, H., Laible, G., Martin, C., Metelmann, C., Schier, H.-M., & Tornette, S. (1988)**. Targets of β-lactams in *Streptococcus pneumoniae*, p. 390-399. In Actor, P., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Salton, M. R. J., Shockman, G. D. (*ed.*), Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Hakenbeck, R., Balmelle, N., Weber, B., Gardes, C., Keck, W. & de Saizieu, A. (2001).** Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **69**, 2477-2486.

**Hakenbeck, R., Grebe, T., Zahner, D. & Stock, J. B. (1999).** beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* **33**, 673-678.

**Hakenbeck, R., Konig, A., Kern, I., van der Linden, M., Keck, W., Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B. & Gutmann, L. (1998).** Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**, 1831-1840.

**Halfmann A. (2004).** Evaluierung eines Reportersystems für *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Hava, D.L., LeMieux, J. & Camilli, A. (2003).** From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **50**, 1103-1110.

**Havarstein, L. S. (1998).** Identification of a competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* by genomic analysis. *Trends Microbiol* **6**, 297-299; discussion 299-300.

**Havarstein, L. S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. A. (1995).** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11140-11144.

**Havarstein, L. S., Hakenbeck, R. & Gaustad, P. (1997).** Natural competence in the genus Streptococcus: evidence that streptococci can change pherotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol* **179**, 6589-6594.

**Havarstein, L. S. & Morrison, D. A. (1999).** Quorum sensing and peptide pheromones in streptococcal competence for genetic transformation. In Cell-Cell Signaling in Bacteria. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). ASM Press, Washington, D.C. 9-26

**Head, C. G., Tardy, A. & Kenney, C. J. (1998).** Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the ompF and ompC regulatory sites. *J Mol Biol* **281**, 857-870.

**van Heijenoort, J. (2001).** Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**, 25R-36R

**Hellingwerf, K. J., Crielaard, W. C., Joost Teixeira de Mattos, M., Hoff, W. D., Kort, R., Verhamme, D. T. & Avignone-Rossa, C. (1998).** Current topics in signal transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **74**, 211-227.

**Hellingwerf, K. J., Postma, P. W., Tommassen, J. & Westerhoff, H. V. (1995).** Signal transduction in bacteria: phospho-neural network(s) in *Escherichia coli*? *FEMS Microbiol Rev.* **16**, 309-321.

**Herschlag, D. & Jencks, W. P. (1990).** Catalysis of the hydrolysis of phosphorylated pyridines by Mg(OH)+: a possible model for enzymatic phosphoryl transfer. *Biochemistry.* **29**, 5172-5179.

**Höltje, J. V. (1996).** A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology.* **142**, 1911-1918.

**Höltje, J.V. (1998).** Growth of the stress bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 181 – 203.

**Höltje, J. V. & Tomasz, A. (1976).** Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem.* **251**, 4199-4207.

**Hoskins, J., Alborn, W.E. Jr, Arnold, J., Blaszczak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R. Jr, Skatrud, P.L. & Glass, J.I. (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J Bacteriol. **183**, 5709-5717.

**Howell, A., Dubrac, S., Noone, D., Varughese, K. I. & Devine, K. (2006).** Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol Microbiol.* **59**, 1199-1215.

**Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. (2002).** Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* **18**, S96-104.

**Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. (2003).** Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **2**, Article 3.

**Hübner, G. (1995).** Stochastik. Eine anwendungsorientierte Einführung für Informatiker, Ingenieure und Mathematiker. 2. Aufl., Vieweg-Verlag, Wiesbaden.

**Hui, F. M., Zhou, L. & Morrison, D. A. (1995).** Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcin A secretion genes. *Gene* **153**, 25-31.

**Hurley, J. H., Dean, A. M., Thorsness, P. E., Koshland, D. E., Jr. & Stroud, R. M. (1990).** Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation involves no long-range conformational change in the free enzyme. *J Biol Chem* **265**, 3599-3602.

**Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. & Mitchell, T. J. (2004).** Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**, 5258-5266.

**Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. & Mitchell, T. J. (2004).** Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **72**, 3584-3591.

**Jencks, W. P. (1980).** The utilization of binding energy in coupled vectorial processes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **51**, 75-106.

**Jourlin, C., Bengrine, A., Chippaux, M. & Mejean, V. (1996).** An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **20**, 1297-1306.

**Kadioglu, A., Echenique, J., Manco, S., Trombe, M. C. & Andrew, P. W. (2003).** The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**, 6676-6679.

**Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Chandran, P. & Ninfa, A. J. (1994).** Effect of mutations in *Escherichia coli* glnL (ntrB), encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J Biol Chem* **269**, 28294-28299.

**Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entian, K. D. & Götz, F. (1988).** Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem.* **177**, 53-59.

**Khorat, A.S. & Tomasz, A. (2006).** Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol.* **60**, 93-107.

**Kilic, A. O., Tao, L., Zhang, Y., Lei, Y., Khammanivong, A. & Herzberg, M. C. (2004).** Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and *in vivo* gene expression. *J Bacteriol.* **186**, 4246-4253.

**Kim, S. K., Wilmes-Riesenberg, M. R. & Wanner, B. L. (1996).** Involvement of the sensor kinase EnvZ in the in vivo activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol.* **22**, 135-147.

**Knutsen, E., Ween, O. & Havarstein, L. S. (2004).** Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **186**, 3078-3085.

**Ko, K. S., Park, S., Oh, W. S., Suh, J. Y., Oh, T., Ahn, S., Chun, J. & Song, J. H. (2006).** Comparative analysis of growth-phase-dependent gene expression in virulent and avirulent *Streptococcus pneumoniae* using a high-density DNA microarray. *Mol Cells.* **21**, 82-8.

**Kovacs, M. (2005).** Das dlt Operon bei *Streptococcus pneumoniae*: Expression und Funktion der Genprodukte beim Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Krauß, J. & Hakenbeck, R. (1997).** A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 936-942.

**Krauß, J., van der Linden, M., Grebe, T. & Hakenbeck, R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **2**, 183-186.

**Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* **305**, 567-580.

**Lacks, S. (1979).** Uptake of circular deoxyribonucleic acid and mechanism of deoxyribonucleic acid transport in genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **138**, 404-409.

**Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. (1960).** A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. *Biochim Biophys Acta.* **39**, 508-518.

**Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

**Lage, J. M., Hamann, S., Gribanov, O., Leamon, J. H., Pejovic, T. & Lizardi, P. M. (2002).** Microgel assessment of nucleic acid integrity and labeling quality in microarray experiments. *Biotechniques.* **32**, 312-314.

**Laible, G. & Hakenbeck, R. (1991).** Five independent combinations of mutations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**, 6986-6990.

**Laible, G., Spratt, B. G. & Hakenbeck, R. (1991).** Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**, 1993-2002.

**Lancefield R.C. (1933).** A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**, 571 – 595.

**Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W. & Amrein, K. E. (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**, 223-234.

**Lapointe, R., Frenette, M., & Vadeboncoeur, C. (1993).** Altered expression of several genes in $III_L^{Man}$-defektive mutants of *Streptococcus salivarius* demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis of cytoplasmic proteins. *Res Microbiol* **144**, 305-316

**Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A. & Holden, D. W. (2001).** A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**, 555-571.

**LeBlanc, D. J., Lee, L. N. & Inamine, J. M. (1991).** Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**, 1804-1810.

**Lee, M. S. & Morrison, D. A. (1999).** Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* **181**, 5004-5016.

**Li, J., Swanson, R. V., Simon, M. I. & Weis, R. M. (1995).** The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* **34**, 14626-14636.

**Limpert, E., Stahel, W.A. & Abbt, M. (2001).** Log-normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues BioScience Vol. **51**, No. 5: 341 – 352.

**Lin, D. C. & Grossman, A. D. (1998).** Identification and characterisation of bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**, 675-685.

**Link, A. J., Phillips, D. & Church, G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol.* **179**, 6228-6237.

**Loomis, W. F., Kuspa, A., Shaulsky, G. & Wang, N. (1998).** Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* **1**, 643-648.

**Loomis, W. F., Shaulsky, G. & Wang, N. (1997).** Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci* **110**, 1141-1145.

**Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. & Stock, J. B. (1992).** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 718-722.

**Lunsford, R. D. & London, J. (1996).** Natural genetic transformation in *Streptococcus gordonii*: comX imparts spontaneous competence on strain wicky. *J Bacteriol.* **178**, 5831-5835.

**Lüttiken R. (1988).** Die Familie der Streptococcaceae. In: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie (eds. H. Brandis, G. Pulverer), 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

**Maes, M. & Messens, E. (1992).** Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4374.

**Maisnier-Patin, S., Berg, O. G., Liljas, L. & Andersson, D. I. (2002).** Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **46**, 355-366.

**Marra, A., Asundi, J., Bartilson, M., Lawson, S., Fang, F., Christine, J., Wiesner, C., Brigham, D., Schneider, W. P. & Hromockyj, A. E. (2002).** Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infect Immun* **70**, 1422-1433.

**Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 202 – 218

**Martin, B., Alloing, G., Mejean, V. & Claverys, J. P. (1987).** Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the ermAM determinant of plasmid pAM beta 1 results from deletion of 5' leader peptide sequences. *Plasmid.* **18**, 250-253.

**Martinez-Hackert, E. & Stock, A. M. (1997).** Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol.* **269**, 301-312.

**Mascher, T. (2001).** Das cia-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Mascher, T., Heintz, M., Zahner, D., Merai, M. & Hakenbeck, R. (2006).** The CiaRH System of *Streptococcus pneumoniae* Prevents Lysis during Stress Induced by Treatment with Cell Wall Inhibitors and by Mutations in pbp2x Involved in {beta}-Lactam Resistance. *J Bacteriol.* **188**, 1959-1968.

**Mascher, T., Margulis, N. G., Wang, T., Ye, R. W. & Helmann, J. D. (2003).** Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol.* **50**, 1591-1604.

**Mascher, T., Zahner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A. B. & Hakenbeck, R. (2003).** The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* **185**, 60-70.

**Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T. A. & Helmann, J. D. (2004).** Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 2888-2896.

**Matsubara, M. & Mizuno, T. (1999).** EnvZ-independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR-mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63**, 408-414.

**Mayover, T. L., Halkides, C. J. & Stewart, R. C. (1999).** Kinetic characterization of CheY phosphorylation reactions: comparison of P-CheA and small-molecule phosphodonors. *Biochemistry.* **38**, 2259-2271.

**McCleary, W. R., Stock, J. B. & Ninfa, A. J. (1993).** Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol.* **175**, 2793-2798.

**McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A. & Mitchell, T. J. (2004).** A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**, 1661-1675.

**Mejean, V. & Claverys, J. P. (1988).** Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet* **213**, 444-448.

**Merai, M. (2003).** Analyse von Zielgenen des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Mitchell, T. J., Alexander, J. E., Morgan, P. J. & Andrew, P. W. (1997).** Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**, 62S-71S.

**Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S. & Archer, G.L. (2003).** Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* **185**, 4638-4643.

**Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. & Saier, M. H., Jr. (2001).** Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol.* **39**, 1366-1381.

**Morrison, D. A. (1997).** Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb Drug Resist* **3**, 27-37.

**Morrison, D. A. & Mannarelli, B. (1979).** Transformation in pneumococcus: nuclease resistance of deoxyribonucleic acid in the eclipse complex. *J Bacteriol* **140**, 655-665.

**Mouz, N., Di Guilmi, A. M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O. & Vernet, T. (1999).** Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem.* **274**, 19175-19180.

**Munoz, R., Musser, J. M., Crain, M., Briles, D. E., Marton, A., Parkinson, A. J., Sorensen, U. & Tomasz, A. (1992).** Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* **15**, 112-118.

**Murphy, N. R. & Hellwig, R. J. (1996).** Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier material. *Biotechniques.* **21**, 934-936, 938-939.

**Muscher D.M., Breiman R.F. and A. Tomasz (2000).** *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21st century. In *Streptococcus pneumoniae* (ed. A. Tomasz), Mary Ann Liebert, Larchmont, USA.

**Nagaev, I., Bjorkman, J., Andersson, D. I. & Hughes, D. (2001).** Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol.* **40**, 433-439.

**Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. (2003).** A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**, 686-723.

**Newton, C.R., Graham, A. (1994).** PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2. Aufl., Heidelberg

**Nieto, C., Espinosa, M. & Puyet, A. (1997).** The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *J Biol Chem.* **272**, 30860-30865.

**Ninfa, A. J., Ninfa, E. G., Lupas, A. N., Stock, A., Magasanik, B. & Stock, J. (1988).** Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 5492-5496.

**Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986).** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7850-7854.

**Novak, R., Cauwels, A., Charpentier, E. & Tuomanen, E. (1999).** Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* **181**, 1126-1133.

**Okamoto, K., Gotoh, N. & Nishino, T. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1964-1971.

**Orihuela, C. J., Radin, J. N., Sublett, J. E., Gao, G., Kaushal, D. & Tuomanen, E. I. (2004).** Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* **72**, 5582-5596.

**Ottolenghi, E. & Hotchkiss, R. D. (1962).** Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med.* **116**, 491-519.

**Pai, H., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W. & Gotoh, N. (2001).** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 480-484.

**Paik, J., Kern, I., Lurz, R. & Hakenbeck, R. (1999).** Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol.* **181**, 3852-3856.

**Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**, 71-112.

**Pasteur, L. (1881).** Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salivie d'un enfant morte de la rage. *Bulletin de l'Academie de Médicine (Paris)* [series 2] **10**, 94-103.

**Paterson, G. K., Blue, C. E. & Mitchell, T. J. (2006).** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol.* **55** (Pt4): 355 – 363

**Patterson, M.J. (1991).** Streptococcus. In Medical Microbiology (ed S. Baron), 3rd ed,. Churchill Livingstone, New York, USA.

**Pearce, B. J., Naughton, A. M. & Masure, H. R. (1994).** Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **12**, 881-892.

**Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. & Hoch, J. A. (1994).** Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**, 1047-1055.

**Perego, M. & Hoch, J. A. (1996).** Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1549-1553.

**Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. (1999).** Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* **7**, 115-120.

**Persson, B. & Argos, P. (1997).** Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J Protein Chem* **16**, 453-457.

**Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. & Götz, F. (1999).** Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*. **274**, 8405-8410.

**Pestova, E. V., Havarstein, L. S. & Morrison, D. A. (1996).** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**, 853-862.

**Peterson, S., Cline, R. T., Tettelin, H., Sharov, V. & Morrison, D. A. (2000).** Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* **182**, 6192-6202.

**Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., Burr, P. C., Do, Y., Ahn, S., Gilbert, J., Fleischmann, R. D. & Morrison, D. A. (2004).** Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol* **51**, 1051-1070.

**Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D. & Brown, P. O. (1999).** Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet.* **23**, 41-46.

**Posas, F. & Saito, H. (1998).** Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO* **17**, 1385-1394.

**Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganelli, R., Havarstein, L. S., Piccoli, L., Simon, D. & Morrison, D. A. (1996).** Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* **178**, 6087-6090.

**Qi, F., Merritt, J., Lux, R. & Shi, W. (2004).** Inactivation of the ciaH Gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infect Immun* **72**, 4895-4899.

**Rasmussen, B. A. & Kovacs, E. (1993).** Cloning and identification of a two-component signal-transducing regulatory system from Bacteroides fragilis. *Mol Microbiol* **7**, 765-776.

**Reichmann, P., Konig, A., Linares, J., Alcaide, F., Tenover, F. C., McDougal, L., Swidsinski, S. & Hakenbeck, R. (1997).** A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal Streptococcus species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* **176**, 1001-1012.

**Reichmann, P., Konig, A., Marton, A. & Hakenbeck, R. (1996).** Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2**, 177-181.

**Reynolds, M. G. (2000).** Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics.* **156**, 1471-1481.

**Ridder, I. S. & Dijkstra, B. W. (1999).** Identification of the Mg2+-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY. *Biochem J.* **339**, 223-226.

**Rieux, V., Carbon, C. & Azoulay-Dupuis, E. (2001).** Complex relationship between acquisition of beta-lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* **184**, 66-72.

**Rimini, R., Jansson, B., Feger, G., Roberts, T. C., de Francesco, M., Gozzi, A., Faggioni, F., Domenici, E., Wallace, D. M., Frandsen, N. & Polissi, A. (2000).** Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol Microbiol* **36**, 1279-1292.

**Robinson, V. L. & Stock, A. M. (1999).** High energy exchange: proteins that make or break phosphoramidate bonds. *Structure Fold Des* **7**, R47-53.

**Romao, S., Memmi, G., Oggioni, M.R. & Trombe, M.C. (2006).** LuxS impacts on LytA-dependent autolysis and on competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology.* **152**, 333-41

**Rutschmann, J. (2003).** PBP2a von *Streptococcus pneumoniae* und seine Rolle bei der β-Lactam-Resistenz. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Sabelnikov, A. G., Greenberg, B. & Lacks, S. A. (1995).** An extended -10 promoter alone directs transcription of the DpnII operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **250**, 144-155.

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487-491.

**Salles, C., Creancier, L., Claverys, J. P. & Mejean, V. (1992).** The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6103.

**Sambrock, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning, a laboratory manual (2nd ed.) CSH Press, New York.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 5463-5467.

**Schaupp, C. J., Jiang, G., Myers, T. G. & Wilson, M. A. (2005).** Active mixing during hybridization improves the accuracy and reproducibility of microarray results. *Biotechniques.* **38**, 117-119.

**Schleifer K.H. & Ludwig W. (1995).** Phylogenetic relationship of lactiv acid bacteria. In The genera of lactiv acid bacteria (eds B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel), Vol.2: Blackie Academic & Professional.

**Schena (2003).** DNA-Microarray. Apractical approach. Oxford University Press.

**Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M. & Weiser, J. N. (2002).** Microarray-based identification of htrA, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **70**, 4059-4067.

**Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M. & Weiser, J. N. (2005).** Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *J Bacteriol* **187**, 3969-3979.

**Selekovitch-Chenu, L., Seroude, L. & Sicard, A. M. (1993).** The role of penicillin-binding protein 3 (PBP3) in cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet* **239**, 77-80

**Selekovitch-Chenu, L., Giammarinaro, P. & Sicard, A. M. (1997).** Molecular characterisation of a mutation affecting the amount of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 3. *Microb Drug Resist* **3**,259-262.

**Shamir, R., Maron-Katz, A., Tanay, A., Linhart, C., Steinfeld, I., Sharan, R., Shiloh, Y. & Elkon, R. (2005).** EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics.* **6**, 232.

**Sicard, A. M. (1964).** A New Synthetic Medium for Diplococcus Pneumoniae, and Its Use for the Study of Reciprocal Transformations at the AmiA Locus. *Genetics.* **50**, 31-44.

**Silva, J. C., Haldimann, A., Prahalad, M. K., Walsh, C. T. & Wanner, B. L. (1998).** *In vivo* characterization of the type A and B vancomycin-resistant enterococci (VRE) VanRS two-component systems in *Escherichia coli*: a nonpathogenic model for studying the VRE signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 11951-11956.

**Singh, M., Berger, B., Kim, P. S., Berger, J. M. & Cochran, A. G. (1998).** Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 2738-2743.

**Smith, A. M. & Klugman, K. P. (2005).** Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 4622-4627.

**Solomon, J. M. & Grossman, A. D. (1996).** Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet* **12**, 150-155.

**Song, J. H., Ko, K. S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., Jeong, J. Y. & Chun, J. (2005).** Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells.* **19**, 365-374.

**Soualhine, H., Brochu, V., Menard, F., Papadopoulou, B., Weiss, K., Bergeron, M.G., Legare, D., Drummelsmith, J. & Ouellette, M. (2005).** A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. *Mol Microbiol.* **58**, 1430-40.

**Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999).** A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339-347.

**Spronk, A. M., Yoshida, H. & Wood, H. G. (1976).** Isolation of 3-phosphohistidine from phosphorylated pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**, 4415-4419.

**Standish, A. J., Stroeher, U. H. & Paton, J. C. (2005).** The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of cbpA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7701-7706.

**Stephenson, K. & Hoch, J. A. (2002).** Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther* **93**, 293-305.

**Stephenson, K. & Hoch, J. A. (2002).** Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 507-512.

**Stephenson, K. & Hoch, J. A. (2002).** Histidine kinase-mediated signal transduction systems of pathogenic microorganisms as targets for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Infect Disord* **2**, 235-246.

**Sternberg, G. M. (1881).** A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *National Board of Health Bulletin* **2**, 781-783.

**Stock, A. M., Martinez-Hackert, E., Rasmussen, B. F., West, A. H., Stock, J. B., Ringe, D. & Petsko, G. A. (1993).** Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry.* **32**, 13375-13380.

**Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000).** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.

**Stock, J. (1999).** Signal transduction: Gyrating protein kinases. *Curr Biol* **9**, R364-367.

**Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 450-490.

**Storey, J.D. & Tibshirani, R. (2001).** Estimatine false discovery rates under dependance with applications to DNA microarrays. *Technical Reports.* 2001-28. Department of Statistics, Stanford University.

**Strominger, J. L., Izaki, K., Matsuhashi, M. & Tipper, D. J. (1967).** Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Fed Proc* **26**, 9-22.

**Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. (2001).** An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 5190-5196.

**Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A. & Stock, J. B. (1996).** Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* **271**, 939-945.

**Swietlo, E., McDaniel, L. S., & Briles, D. E. (2004).** Choline binding proteins. *In* The Pneumococcus. Tuomanen, E. I., Mitchell, T. J., Morrison, D. A. & Spratt, B. G. (*eds.*). Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 49-60.

**Tanford, C. (1984).** The sarcoplasmic reticulum calcium pump. Localization of free energy transfer to discrete steps of the reaction cycle. *FEBS Lett* **166**, 1-7.

**Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K. & Fraser, C.M. (2001).** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* **293**, 498-506.

**Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M. & Burnham, M. K. (2000).** A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**, 566-576.

**Tomasz, A. (1965).** Control of the competent state in Pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* **208**, 155-159.

**Tomasz A. (1997).** Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 24 (Suppl. 1), S85-S88.

**Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M. & Ikura, M. (1999).** Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* **6**, 729-734.

**Tortosa, P. & Dubnau, D. (1999).** Competence for transformation: a matter of taste. *Curr Opin Microbiol* **2**, 588-592.

**Trombe, M. C. (1993).** Characterization of a calcium porter of *Streptococcus pneumoniae* involved in calcium regulation of growth and competence. *J Gen Microbiol* **139**, 433-439.

**Tuomanen, E. (2000)**. *Streptococcus pneumoniae.* In: The Prokarytos, release 3.2, http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=264&initsec=01_00.

**Verhamme, D. T., Arents, J. C., Postma, P. W., Crielaard, W. & Hellingwerf, K. J. (2002).** Investigation of *in vivo* cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*. *Microbiology.* **148**, 69-78.

**Veyrat, A., Monedero, V. & Perez-Martinez, G. (1994).** Glucose transport by the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its role in carbon catabolite repression. *Microbiology.* **140**, 1141-1149.

**Volz, K. & Matsumura, P. (1991).** Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-A resolution. *J Biol Chem.* **266**, 15511-15519.

**Wacker, I., Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H. M., Detsch, C. & Stulke, J. (2003).** The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the gltAB operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology.* **149**, 3001-3009.

**Wagner, C., Saizieu Ad, A., Schonfeld, H. J., Kamber, M., Lange, R., Thompson, C. J. & Page, M. G. (2002).** Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon. *Infect Immun.* **70**, 6121-6128.

**Wanner, B. L. (1992).** Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol.* **174**, 2053-2058.

**Ween, O., Gaustad, P. & Havarstein, L. S. (1999).** Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **33**, 817-827.

**Weickert, M. J. & Chambliss, G. H. (1990).** Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 6238-6242.

**Weiss, V. & Magasanik, B. (1988).** Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8919-8923.

**West, A. H. & Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.

**Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. & Sahl, H. G. (2001).** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem.* **276**, 1772-1779.

**Wolf, H. (1999).** Wirkungsweise von Antibiotika. Kompendium zur Vorlesung.

**Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. & Bridger, W. A. (1994).** The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-A resolution. *J Biol Chem.* **269**, 10883-10890.

**Wright, G. D., Holman, T. R., Walsh, C. T., Chen, Y., Reizer, J., Saier, M. H., Jr., Fairbrother, W. J. & Wright, P. E. (1993).** Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147 Mapping of the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIAglc. *Biochemistry* **32**, 5057-5063.

**Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P. & Speed, T.P.** (2001). Normalization for cDNA microarray data. In *In Microarrays: optical technologies and informatics*. *Volume 4266*. Edited by: Bittner M, Chen Y, Dorsel A, Dougherty ER. San Jose, CA, USA: SPIE; 2001:141-152.

**Zähner, D., Grebe, T., Guenzi, E., Krauss, J., van der Linden, M., Terhune, K., Stock, J. B. & Hakenbeck, R. (1996).** Resistance determinants for beta-lactam antibiotics in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are involved in genetic competence. *Microb Drug Resist* **2**, 187-191.

**Zähner, D. (1999).** Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-Systems cia von *Streptococcus pneumoniae*. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

**Zähner, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Meral, M. & Hakenbeck, R. (2002).** The ciaR/ciaH regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 211-216.

**Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J. A. & Varughese, K. I. (2000).** A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure.* **8**, 851-862.

**Zapf, J. W., Hoch, J. A. & Whiteley, J. M. (1996).** A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates. *Biochemistry.* **35**, 2926-2933.

**Zhang, X. M., Yin, Y. B., Zhu, D., Chen, B. D., Luo, J. Y., Deng, Y. P., Liu, M. F., Chen, S. H., Meng, J. P., Lan, K., Huang, Y. S. & Kang, G. F. (2005).** The effect of transformation on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol.* **43**, 337-344.

# 6. Anhang

**Tab. 6.1: Wachstumsphasen-abhängige Transkription im R6-Wildtyp**

| Gennummer | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | Gennummer | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0013 spr1819* | **1,77** | 0,87 | 1,02 | 0,96 | **0,30** | *spr0267* | 0,84 | 0,77 | 0,86 | 1,20 | **2,00** |
| *spr0031* | 1,32 | 1,36 | 0,88 | 0,85 | **0,46** | *spr0271* | 1,05 | 1,19 | 1,00 | 1,00 | **0,26** |
| *spr0040* | **0,26** | 0,29 | 0,77 | **1,74** | **1,88** | *spr0276* | 0,42 | 0,47 | 0,93 | 1,37 | **2,92** |
| *spr0043* | 1,67 | 1,17 | 1,04 | 0,71 | **0,33** | *spr0310* | 1,70 | 2,23 | **0,42** | **0,39** | **0,57** |
| *spr0045* | **0,04** | **0,05** | 0,30 | 1,78 | **6,91** | *spr0311* | 2,03 | 2,16 | **0,37** | **0,39** | 0,68 |
| *spr0046* | **0,04** | **0,07** | 0,29 | 1,66 | **7,16** | *spr0327* | 1,08 | 1,26 | 1,03 | 1,09 | **0,35** |
| *spr0047* | 0,13 | 0,18 | **0,26** | 1,51 | **6,36** | *spr0380* | 1,00 | 1,21 | 1,13 | 1,03 | **0,48** |
| *spr0048* | **0,18** | **0,16** | 0,35 | 1,16 | **6,54** | *spr0387* | 0,94 | 1,27 | 1,15 | 0,85 | **0,39** |
| *spr0049* | 0,44 | **0,36** | **0,40** | 1,07 | **4,89** | *spr0443* | 0,59 | **0,35** | 0,83 | 0,81 | **3,93** |
| *spr0050* | **0,13** | **0,13** | 0,30 | 1,22 | **6,15** | *spr0444* | 0,70 | **0,49** | 0,89 | 0,93 | 3,89 |
| *spr0051* | **0,10** | **0,14** | **0,28** | 1,24 | **6,77** | *spr0461* | **0,15** | **0,23** | 0,66 | 1,48 | **3,24** |
| *spr0052* | **0,10** | **0,17** | 0,47 | 1,33 | **5,66** | *spr0462* | **0,37** | **0,49** | 0,90 | 1,83 | 1,45 |
| *spr0053* | **0,11** | **0,20** | 0,43 | 1,21 | **5,49** | *spr0463* | **0,54** | **0,49** | 0,84 | 1,96 | 1,70 |
| *spr0054* | 0,74 | 0,63 | 0,59 | 0,72 | **3,72** | *spr0467* | **0,34** | **0,37** | 1,25 | 2,44 | 1,02 |
| *spr0055* | 0,61 | 0,55 | 0,59 | 0,84 | **4,56** | *spr0468* | **0,37** | **0,43** | 1,12 | 2,38 | 0,94 |
| *spr0056* | **0,50** | 0,56 | 0,71 | 1,17 | **3,52** | *spr0469* | **0,23** | 0,44 | 1,50 | 2,15 | 0,82 |
| *spr0078* | 1,60 | 0,84 | 1,11 | 0,99 | **0,32** | *spr0470* | **0,14** | **0,25** | 0,75 | 2,26 | **1,76** |
| *spr0081* | 0,58 | 0,67 | **2,19** | 1,25 | 1,62 | *spr0471* | **0,12** | **0,23** | 0,86 | 2,02 | **1,92** |
| *spr0141* | 0,60 | 0,63 | 0,87 | 1,20 | **3,22** | *spr0472* | **0,13** | **0,23** | 0,86 | **2,56** | **2,00** |
| *spr0142* | 0,63 | 0,79 | 1,06 | 1,18 | **3,29** | *spr0473* | **0,17** | **0,22** | 0,77 | **2,44** | 2,63 |
| *spr0187* | 1,36 | 1,01 | 1,18 | 1,15 | **0,17** | *spr0474* | **0,11** | **0,21** | 0,70 | 1,93 | 2,09 |
| *spr0188* | 0,99 | 0,87 | 1,20 | 1,05 | **0,19** | *spr0479* | 1,19 | 1,00 | 1,15 | 1,09 | **0,49** |
| *spr0190* | 1,05 | 0,84 | 1,32 | 1,24 | **0,21** | *spr0480* | 1,02 | 1,08 | 1,13 | 1,08 | **0,48** |
| *spr0191* | 0,93 | 0,80 | 1,21 | 1,06 | **0,17** | *spr0504* | 1,10 | **1,41** | 1,63 | 0,65 | **0,24** |
| *spr0192* | 1,26 | 0,88 | 1,46 | 1,22 | **0,17** | *spr0614* | **0,25** | 1,04 | 1,25 | 0,99 | 1,15 |
| *spr0194* | 0,91 | 0,93 | 1,29 | 1,09 | **0,16** | *spr0617* | 0,91 | **2,04** | 1,17 | 0,72 | **0,42** |
| *spr0195* | 0,96 | 0,81 | 1,23 | 1,28 | **0,16** | *spr0652* | 1,59 | **1,49** | 0,83 | **0,39** | 0,67 |
| *spr0196* | 0,92 | 0,90 | **1,26** | 1,06 | **0,17** | *spr0668* | 1,39 | 1,94 | **0,42** | **0,41** | 0,54 |
| *spr0197* | 0,98 | 1,04 | 1,27 | 1,13 | **0,14** | *spr0682* | 1,08 | 1,18 | 1,03 | 0,88 | **0,34** |
| *spr0198* | 1,12 | 0,96 | **1,35** | 1,06 | **0,19** | *spr0757* | 1,14 | 0,82 | 1,22 | 1,21 | **0,46** |
| *spr0199* | 1,09 | 0,95 | 1,27 | 1,08 | **0,19** | *spr0778* | **2,41** | 1,17 | 0,33 | 0,37 | 0,41 |
| *spr0200* | 0,86 | 0,98 | 1,19 | 1,06 | **0,20** | *spr0779* | **2,08** | 1,77 | 0,39 | 0,51 | 0,24 |
| *spr0201* | 1,09 | 0,99 | 1,46 | 1,33 | **0,23** | *spr0782* | 1,44 | 0,73 | **0,32** | **0,36** | 2,14 |
| *spr0203* | 1,08 | 0,99 | 1,38 | 1,01 | **0,15** | *spr0819* | 1,25 | 1,20 | 1,14 | 1,07 | **0,16** |
| *spr0204* | 1,13 | 0,99 | 1,22 | 1,17 | **0,25** | *spr0820* | 1,17 | 1,27 | 1,21 | 0,96 | **0,21** |
| *spr0205* | 1,10 | 1,02 | 1,40 | 1,11 | **0,23** | *spr0822* | 1,04 | 1,04 | 1,37 | 1,03 | **0,21** |
| *spr0206* | 1,08 | 1,02 | 1,16 | 1,11 | **0,26** | *spr0825* | **0,36** | **0,47** | 0,80 | 1,60 | **2,00** |
| *spr0207* | 1,22 | 0,92 | 1,36 | 1,20 | **0,20** | *spr0860* | 1,11 | 1,18 | 1,15 | 0,96 | **0,30** |
| *spr0210* | 1,25 | 0,95 | 1,27 | 1,53 | **0,26** | *spr0861* | 1,33 | 0,91 | 1,17 | 1,08 | **0,23** |
| *spr0211* | 1,49 | 1,02 | 1,09 | 1,21 | **0,30** | *spr0863* | 0,98 | 0,85 | 1,20 | 0,99 | **0,28** |
| *spr0212* | 1,21 | 0,91 | 1,19 | 1,20 | **0,26** | *spr0866* | **0,21** | 1,18 | **1,43** | 0,82 | 1,20 |
| *spr0213* | 1,06 | 0,84 | 1,13 | 0,92 | **0,27** | *spr0881* | 1,69 | 1,08 | 1,21 | 0,93 | **0,48** |
| *spr0214* | 1,15 | 0,76 | 1,18 | 1,55 | **0,23** | *spr0883* | 1,33 | 0,97 | 1,29 | 1,14 | **0,27** |
| *spr0215* | 1,30 | 0,90 | 1,25 | 1,02 | **0,19** | *spr0908* | 1,02 | 1,03 | 1,41 | 1,28 | **0,22** |
| *spr0245* | 1,04 | 0,99 | 1,16 | 1,02 | **0,49** | *spr0931* | 1,54 | 0,82 | **0,42** | **0,38** | 2,00 |
| *spr0250* | 1,12 | **0,80** | 1,35 | 1,06 | **0,46** | *spr1013* | 1,06 | 0,92 | 0,80 | 0,98 | **0,31** |
| *spr0264* | **0,15** | **0,24** | **0,84** | 2,39 | **3,23** | *spr1041* | 1,32 | 0,84 | 1,38 | 1,30 | **0,37** |
| *spr0265* | **0,20** | **0,28** | 0,88 | 2,38 | **3,47** | *spr1060* | 1,01 | 1,03 | 1,49 | 1,41 | **0,38** |

| **Fortsetzung Tab. 6.1:** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gennummer | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | Gennummer | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 |
| *spr1071* | 1,27 | 1,55 | 1,23 | **0,45** | 0,49 | *spr1698* | 1,87 | 2,28 | **0,08** | **0,05** | **0,06** |
| *spr1073* | 0,63 | **0,85** | 1,10 | 1,29 | **2,03** | *spr1699* | 1,92 | 2,18 | **0,07** | **0,08** | 0,06 |
| *spr1109* | 0,78 | **0,68** | 1,12 | 1,67 | **2,88** | *spr1756* | 0,96 | 1,19 | 1,09 | 0,96 | **0,42** |
| *spr1128* | 0,96 | **0,71** | 1,24 | 1,28 | **2,03** | *spr1758* | 1,15 | **1,15** | 0,85 | 0,86 | **0,46** |
| *spr1142* | 1,13 | 1,04 | 1,20 | 1,09 | **0,41** | *spr1766* | **0,31** | 0,50 | 0,73 | 1,82 | **3,02** |
| *spr1146* | 0,54 | **0,50** | **0,48** | 0,62 | **4,04** | *spr1769* | **0,47** | **0,54** | 0,90 | **2,54** | 1,33 |
| *spr1147* | 0,49 | **0,50** | **0,49** | 0,60 | **4,44** | *spr1770* | **0,50** | 0,54 | 1,04 | **2,05** | 1,03 |
| *spr1148* | 0,42 | **0,43** | 0,61 | 0,72 | 4,57 | *spr1776* | 1,20 | 1,19 | **1,26** | 0,95 | **0,32** |
| *spr1149* | 0,82 | **0,42** | 0,44 | 0,74 | **4,66** | *spr1777* | 0,96 | 1,28 | 1,07 | 0,90 | **0,42** |
| *spr1153* | **0,24** | 0,95 | 1,24 | 0,74 | 1,07 | *spr1786* | 0,90 | 1,33 | 1,04 | 1,00 | **0,46** |
| *spr1154* | **0,26** | 0,88 | 1,32 | 0,88 | 1,44 | *spr1787* | 0,87 | 0,74 | 0,86 | 0,84 | **2,16** |
| *spr1155* | **0,32** | 0,87 | 1,12 | 0,92 | 1,33 | *spr1800* | 0,55 | 0,64 | 0,84 | 1,58 | **2,96** |
| *spr1202* | **0,59** | 0,69 | 1,06 | 1,13 | **2,12** | *spr1801* | **0,45** | 0,66 | 0,96 | 1,63 | **3,12** |
| *spr1205* | **0,56** | 0,67 | 0,83 | 0,87 | **2,47** | *spr1802* | **0,63** | **0,55** | 0,96 | **1,72** | **2,70** |
| *spr1243* | 1,22 | 1,17 | 1,30 | 1,26 | **0,46** | *spr1829* | 1,19 | 1,30 | 1,05 | 1,20 | **0,42** |
| *spr1244* | 0,93 | 0,94 | 1,22 | 1,03 | **0,47** | *spr1831* | 1,52 | 2,02 | 0,92 | 0,92 | **0,44** |
| *spr1310* | **0,64** | 0,73 | 0,76 | 0,67 | **4,60** | *spr1835* | 1,16 | **1,52** | 0,98 | 0,95 | **0,38** |
| *spr1379* | **0,31** | 0,70 | 1,38 | **2,25** | 1,46 | *spr1844* | 1,16 | 0,97 | 1,20 | 1,21 | **0,43** |
| *spr1380* | **0,27** | 0,78 | 1,09 | **1,87** | **1,62** | *spr1856* | 1,24 | 1,03 | 0,92 | 0,87 | **0,33** |
| *spr1381* | **0,31** | 0,69 | 1,30 | **2,56** | **1,54** | *spr1857* | 1,28 | 1,11 | 0,98 | 0,90 | **0,41** |
| *spr1382* | **0,33** | **0,64** | 1,06 | 1,82 | 1,79 | *spr1858* | 1,21 | 1,28 | 0,90 | 0,82 | **0,41** |
| *spr1386* | 1,15 | 1,21 | 1,13 | 1,08 | **0,41** | *spr1859* | 1,27 | **1,32** | 0,93 | 0,87 | **0,33** |
| *spr1394* | 1,10 | 0,97 | 1,32 | 0,98 | **0,28** | *spr1861* | 1,58 | 1,21 | 1,05 | 0,82 | **0,31** |
| *spr1396* | 1,19 | 1,00 | 1,04 | 1,12 | **0,31** | *spr1862* | 1,28 | 1,27 | 0,75 | 0,75 | **0,35** |
| *spr1425* | 0,98 | 0,84 | 0,92 | 0,95 | **2,00** | *spr1863* | 1,47 | 1,06 | 0,94 | 0,87 | **0,35** |
| *spr1427* | 0,97 | 0,84 | 0,86 | 0,90 | **2,14** | *spr1869* | 1,33 | 1,34 | 1,05 | 0,85 | **0,33** |
| *spr1429* | 0,88 | 0,85 | 0,71 | 0,76 | **2,61** | *spr1873* | **2,05** | 0,88 | 0,72 | 0,67 | **0,64** |
| *spr1437* | 1,21 | **2,27** | **0,45** | **0,42** | 0,47 | *spr1874* | **2,06** | 1,14 | 0,94 | 0,72 | 0,86 |
| *spr1441* | **0,35** | **0,39** | 0,68 | 1,69 | **3,81** | *spr1875* | **2,37** | 0,89 | 0,60 | 0,57 | 0,52 |
| *spr1476* | **0,45** | 0,60 | 0,79 | **1,55** | 1,62 | *spr1916* | 1,76 | 1,30 | **0,32** | **0,27** | 0,91 |
| *spr1488* | **0,74** | 0,91 | **1,24** | 1,20 | **0,47** | *spr1917* | 1,90 | 1,39 | **0,28** | **0,21** | 0,69 |
| *spr1546* | 1,09 | 0,76 | 0,92 | 1,44 | **2,34** | *spr1919* | 1,45 | 2,23 | **0,41** | **0,29** | 0,41 |
| *spr1547* | **0,80** | **0,50** | 0,64 | 1,23 | **3,42** | *spr1920* | 1,08 | 1,89 | **0,42** | 0,47 | 0,55 |
| *spr1548* | **0,81** | 0,57 | **0,65** | 1,20 | **3,70** | *spr1936* | **0,35** | 0,55 | 1,65 | 1,43 | 1,44 |
| *spr1549* | **0,89** | **0,39** | **0,67** | 1,24 | **3,85** | *spr1937* | **0,42** | 0,65 | 1,22 | 1,81 | 1,56 |
| *spr1565* | **2,02** | 1,22 | **0,59** | **0,46** | 0,66 | *spr1938* | **0,41** | 0,66 | 1,09 | 1,25 | 1,60 |
| *spr1566* | 2,61 | 1,28 | **0,15** | **0,10** | 0,17 | *spr1943* | 1,06 | 1,16 | 1,18 | 1,05 | **0,35** |
| *spr1568* | **3,08** | 1,16 | 0,50 | 0,63 | 0,59 | *spr1967* | 0,99 | 1,73 | 0,92 | **0,40** | 1,44 |
| *spr1569* | **2,79** | 1,16 | 0,45 | 0,66 | 0,46 | *spr2012* | 1,78 | 0,95 | 0,85 | 0,79 | **0,26** |
| *spr1599* | 0,97 | 0,96 | 1,39 | 1,25 | **0,48** | *spr2018* | 1,01 | 0,73 | **0,59** | 0,85 | **3,92** |
| *spr1662* | 0,14 | 0,26 | 0,79 | 1,72 | **5,89** | *spr2045* | 1,86 | 0,86 | 0,47 | **0,38** | 1,78 |
| *spr1680* | 0,44 | 1,09 | 0,84 | 0,92 | **2,21** | *spr2046* | 1,21 | 1,00 | **0,45** | **0,33** | 1,71 |

Diese Tabelle gibt alle Gene wieder, die in einer R6-Wachstumskurve zu einem der 5 untersuchten Zeitpunkte mehr als 2-fach signifikant unterschiedlich transkribiert wurden. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant.

**Tab. 6.2: Medien-abhängig transkribierte Gene**

| Gennummer | Ratio | Gennummer | Ratio | Gennummer | Ratio | Gennummer | Ratio |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0013 spr1819* | **23,73** | *spr0413* | **2,56** | *spr0866* | **4,51** | *spr1549* | **8,93** |
| *spr0020* | **39,56** | *spr0440* | **0,11** | *spr0881* | **12,48** | *spr1638* | **2,16** |
| *spr0030* | **31,47** | *spr0443* | **0,49** | *spr0931* | **0,44** | *spr1662* | **5,22** |
| *spr0040* | **5,46** | *spr0461* | **5,36** | *spr0996* | **5,50** | *spr1667* | **0,08** |
| *spr0043* | **20,85** | *spr0466* | **2,24** | *spr1064* | **0,40** | *spr1668* | **0,17** |
| *spr0045* | **9,21** | *spr0467* | **2,82** | *spr1065* | **0,41** | *spr1669* | **0,38** |
| *spr0047* | **2,69** | *spr0468* | **2,87** | *spr1066* | **0,37** | *spr1699* | **2,18** |
| *spr0049* | **3,73** | *spr0469* | **7,17** | *spr1069* | **0,04** | *spr1703* | **2,14** |
| *spr0050* | **3,70** | *spr0470* | **16,40** | *spr1070* | **0,06** | *spr1724* | **81,71** |
| *spr0052* | **2,47** | *spr0471* | **16,63** | *spr1071* | **0,05** | *spr1754* | **2,70** |
| *spr0053* | **2,92** | *spr0472* | **10,64** | *spr1072* | **0,05** | *spr1756* | **2,98** |
| *spr0057* | **0,11** | *spr0473* | **11,48** | *spr1073* | **0,05** | *spr1762* | **3,41** |
| *spr0061* | **0,44** | *spr0474* | **11,21** | *spr1074* | **0,05** | *spr1764* | **2,28** |
| *spr0063* | **0,39** | *spr0534* | **0,39** | *spr1075* | **0,08** | *spr1768* | **2,22** |
| *spr0065* | **0,44** | *spr0561* | **0,25** | *spr1076* | **0,07** | *spr1769* | **2,62** |
| *spr0081* | **0,35** | *spr0565* | **0,41** | *spr1077* | **0,46** | *spr1770* | **2,49** |
| *spr0082* | **0,13** | *spr0600* | **3,21** | *spr1079* | **0,47** | *spr1801* | **3,38** |
| *spr0083* | **0,10** | *spr0613* | **5,00** | *spr1109* | **2,29** | *spr1829* | **2,35** |
| *spr0095* | **0,47** | *spr0614* | **7,41** | *spr1128* | **2,13** | *spr1856* | **82,24** |
| *spr0127* | **76,29** | *spr0615* | **5,16** | *spr1153* | **4,73** | *spr1858* | **58,20** |
| *spr0135* | **0,39** | *spr0617* | **2,83** | *spr1251* | **5,36** | *spr1861* | **64,50** |
| *spr0182* | **2,49** | *spr0618* | **3,01** | *spr1282* | **2,19** | *spr1862* | **65,64** |
| *spr0264* | **11,55** | *spr0633* | **0,30** | *spr1353* | **2,11** | *spr1863* | **72,91** |
| *spr0278* | **5,95** | *spr0634* | **0,39** | *spr1354* | **2,47** | *spr1874* | **0,45** |
| *spr0291* | **3,81** | *spr0652* | **2,14** | *spr1378* | **3,81** | *spr1910* | **2,55** |
| *spr0327* | **2,61** | *spr0660* | **2,16** | *spr1379* | **9,03** | *spr1945* | **0,21** |
| *spr0342* | **0,48** | *spr0663* | **3,31** | *spr1380* | **8,23** | *spr1949* | **0,17** |
| *spr0343* | **0,41** | *spr0759* | **2,15** | *spr1381* | **7,82** | *spr1950* | **0,12** |
| *spr0344* | **0,42** | *spr0786* | **2,44** | *spr1382* | **8,35** | *spr1951* | **0,10** |
| *spr0347* | **0,50** | *spr0788* | **2,28** | *spr1458* | **2,22** | *spr1952* | **0,08** |
| *spr0389* | **4,65** | *spr0825* | **2,54** | *spr1476* | **2,26** | *spr1962* | **2,49** |
| *spr0401* | **2,69** | *spr0856* | **33,09** | *spr1492* | **0,42** | *spr1964* | **0,37** |
| *spr0402* | **2,34** | *spr0857* | **12,86** | *spr1496* | **0,48** | *spr1966* | **0,45** |
| *spr0403* | **3,35** | *spr0858* | **12,03** | *spr1546* | **2,24** | *spr2006* | **79,61** |
| *spr0404* | **3,26** | *spr0859* | **7,17** | *spr1547* | **3,24** | *spr2012* | **83,07** |
| *spr0405* | **3,62** | *spr0860* | **2,76** | *spr1548* | **3,96** | | |

Die Transkriptome einer R6-Kultur gewachsen in CpH8-bzw. in THB-Medium wurden miteinander verglichen. Die hier aufgelisteten Gene wurden mindestens 2-fach unterschiedlich und statistisch siginifikant (FDR < 1%) transkribiert.

**Tab. 6.3: CiaRH-abhängig transkribierte Gene**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N30 | N40 | N40 | N30 |
| *spr0013 spr1819* | *comX* | 0,46 | 0,98 | 1,93 | 4,82 | 2,84 | **0,10** | 1,32 | 1,10 | 0,62 |
| *spr0020* | Hypoth. | 0,74 | 1,12 | 1,78 | 2,33 | 3,48 | **0,08** | 1,02 | **1,06** | 0,93 |
| *spr0030* | Hypoth. | 1,12 | 1,27 | 1,33 | 2,32 | 2,28 | **0,12** | **1,58** | 1,11 | 0,61 |
| *spr0031* | Hypoth. | 0,92 | 1,22 | 1,18 | 2,59 | 2,27 | **0,17** | 1,14 | 1,07 | 0,92 |
| *spr0040* | *thmA* | **0,44** | 0,74 | 1,04 | 1,54 | 1,55 | **0,14** | **3,91** | 0,96 | **0,29** |
| *spr0043* | *comA* | 0,53 | 0,87 | 2,32 | 5,26 | 4,61 | **0,09** | 1,35 | 1,18 | 1,38 |
| *spr0049* | *purN* | 0,80 | 1,04 | 1,41 | 1,17 | 1,03 | **0,47** | 1,49 | 0,75 | 0,92 |
| *spr0081* | ABC-MSP | 1,97 | 1,02 | 1,47 | 1,06 | 1,22 | 3,04 | 3,06 | **2,60** | 1,16 |
| *spr0096* | Hypoth. | 0,97 | 1,35 | 0,88 | 1,00 | 0,99 | 1,37 | 0,66 | **0,31** | **1,74** |
| *spr0101* | ABC-SBP | 0,77 | 0,58 | **0,36** | **0,44** | 0,68 | **0,51** | 0,63 | 1,11 | **0,39** |
| *spr0127* | orf51 | 0,76 | 0,87 | 1,30 | 3,97 | 5,92 | **0,07** | 1,89 | **2,14** | 0,53 |
| *spr0128* | Hypoth. | 1,01 | 1,04 | 1,68 | 1,84 | 5,70 | **0,07** | **2,27** | **2,11** | 0,50 |
| *spr0157* | Hypoth. | **2,02** | **1,99** | 1,55 | 1,11 | 0,98 | 0,93 | 1,18 | 1,02 | 1,06 |
| *spr0161* | *ribE* | 2,01 | **2,38** | 1,65 | 1,21 | 0,91 | 0,97 | 1,05 | 1,55 | 1,63 |
| *spr0181* | orf47 | 0,86 | 1,29 | 1,44 | 1,80 | 1,16 | **0,46** | 1,36 | 0,97 | 0,90 |
| *spr0276* | *bglA* | 2,70 | 2,43 | **4,63** | 4,60 | 4,53 | 3,83 | **0,14** | **0,54** | **23,34** |
| *spr0277* | Hypoth. | 2,25 | 2,56 | **4,72** | **5,60** | 5,68 | **2,02** | **0,16** | **0,59** | **21,52** |
| *spr0278* | PTS-EII | **2,07** | **2,86** | 2,60 | **2,76** | **3,01** | **1,92** | **0,25** | **1,48** | **5,01** |
| *spr0279* | *bglG* | **2,01** | **2,39** | 3,07 | **4,86** | **4,23** | 2,33 | **0,17** | **0,58** | **10,77** |
| *spr0280* | PTS-EII | **2,51** | 2,02 | **2,81** | 3,02 | 3,24 | **1,65** | **0,24** | **0,71** | **9,31** |
| *spr0281* | hypoth. | 2,34 | 2,92 | 2,72 | 4,54 | 3,24 | **2,15** | **0,24** | **0,57** | **13,09** |
| *spr0282* | PTS-EII | 2,29 | **2,42** | **3,27** | 4,09 | 3,07 | 2,24 | **0,27** | **0,60** | **16,47** |
| *spr0291* | PTS-EII | 0,86 | 0,74 | 0,83 | 0,83 | 0,91 | **0,41** | 1,19 | 1,18 | 0,69 |
| *spr0343* | *hk03* | 0,65 | **0,42** | 0,67 | 0,81 | 0,88 | 0,80 | 0,94 | 0,89 | 0,96 |
| *spr0344* | *rr03* | 0,65 | **0,40** | **0,58** | 0,94 | 0,90 | 0,76 | 1,00 | **0,87** | 0,98 |
| *spr0345* | alkD-trunc. | 0,65 | **0,35** | **0,69** | 1,30 | 1,14 | 0,82 | 0,88 | 0,93 | 0,83 |
| *spr0347* | alkD-trunc. | 0,89 | **0,43** | 0,72 | 0,92 | 0,84 | 0,69 | 0,88 | 0,90 | 0,79 |
| *spr0358* | *mtlF* | | | | | | **2,44** | 0,55 | | 1,63 |
| *spr0388* | hypoth. | 1,00 | 1,47 | 1,35 | 2,14 | 2,48 | **0,20** | 1,54 | 1,68 | 1,25 |
| *spr0389* | hypoth. | 1,14 | 1,20 | 1,65 | 1,31 | 1,20 | **0,24** | 1,11 | 1,64 | 1,14 |
| *spr0413* | *bacA* | 0,48 | **0,74** | 1,09 | 1,21 | 1,30 | **0,33** | **2,28** | 0,97 | **0,46** |
| *spr0443* | *glnR* | 0,65 | 1,30 | 1,88 | 1,30 | 0,95 | **2,83** | 1,63 | 1,17 | 0,80 |
| *spr0444* | *glnA* | 0,61 | 0,86 | 2,99 | 1,79 | 1,90 | **2,90** | 1,39 | 1,13 | 0,76 |
| *spr0447* | *xerD* | 1,90 | 2,62 | 2,38 | 1,55 | 0,95 | **2,74** | 1,17 | **1,92** | 1,15 |
| *spr0448* | *hsdS* | **2,64** | **2,73** | **2,99** | **2,11** | **2,00** | **2,29** | **3,64** | **2,77** | 0,99 |
| *spr0453* | *hrcA* | 0,68 | **0,40** | 1,07 | 1,69 | **1,86** | 0,80 | 1,25 | 0,71 | 1,13 |
| *spr0454* | *grpE* | 0,60 | **0,47** | 1,05 | 1,47 | 1,40 | 1,12 | 1,11 | **0,68** | 0,92 |
| *spr0461* | *blpT* | 0,58 | 0,72 | 1,42 | 2,22 | 2,45 | **0,16** | **3,64** | 0,92 | **0,30** |
| *spr0462* | *blpS* | 0,71 | 0,86 | 1,20 | 1,42 | 1,43 | **0,49** | 2,31 | 0,95 | 0,39 |
| *spr0463* | *rr13* | 1,01 | 0,85 | 1,14 | 0,91 | 1,14 | **0,48** | **2,65** | 1,03 | **0,54** |
| *spr0465* | ip | 0,70 | 0,89 | 1,33 | 1,05 | 0,77 | **0,37** | 2,05 | 0,92 | **0,52** |
| *spr0469* | hypoth. | 0,66 | 1,06 | 1,75 | 1,60 | 1,74 | **0,38** | 2,26 | 1,08 | 0,55 |
| *spr0470* | hypoth. | 0,46 | 0,79 | 1,08 | 1,14 | 1,32 | **0,05** | **5,59** | 1,24 | **0,30** |
| *spr0471* | hypoth. | 0,45 | 0,85 | 1,17 | 1,55 | 1,53 | **0,05** | 3,89 | 1,21 | 0,59 |
| *spr0472* | *blpY* | 0,45 | 0,78 | 1,11 | 1,13 | 1,50 | **0,04** | **6,42** | 1,07 | **0,29** |
| *spr0473* | *blpZ* | 0,56 | 0,81 | 1,14 | 1,60 | 1,65 | **0,10** | **5,43** | 1,02 | **0,32** |
| *spr0474* | *pncP* | 0,36 | 0,65 | 1,10 | 1,70 | 1,64 | **0,04** | **5,99** | 0,97 | **0,24** |
| *spr0504* | *licT* | 0,66 | 0,46 | 0,55 | **0,44** | 0,71 | **1,75** | 1,43 | **0,54** | 0,47 |
| *spr0505* | PTS-EII | 0,70 | 0,37 | 0,77 | 0,66 | 0,48 | **2,28** | 1,19 | **0,57** | 0,67 |
| *spr0506* | *bglH* | 1,01 | 0,54 | 0,77 | 0,73 | 0,78 | **1,53** | 1,13 | **0,63** | **0,50** |
| *spr0542* | hypoth. | 2,14 | 1,80 | 1,34 | 0,98 | 1,16 | 1,30 | **0,39** | **0,41** | 2,52 |
| *spr0564* | PTS-EII | 1,15 | 0,79 | 0,92 | 1,55 | 1,57 | **2,15** | 1,04 | 1,07 | 1,03 |
| *spr0613* | *pyrF* | 0,61 | 0,64 | 1,67 | 1,15 | 0,99 | 1,45 | 0,84 | **2,55** | 1,09 |
| *spr0614* | *pyrE* | 0,71 | 0,93 | 2,01 | 1,20 | 1,06 | 1,29 | 1,17 | **2,79** | 1,27 |

**Fortsetzung Tab. 6.3**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N10 | N20 | N40 | N40 |
| *spr0615* | hypoth. | 1,20 | 1,25 | 1,07 | 0,87 | 0,90 | 0,93 | 1,30 | **2,47** | 0,93 |
| *spr0617* | hypoth. | 0,97 | 0,86 | 0,99 | 1,01 | 0,94 | 0,87 | 1,36 | **2,08** | 1,07 |
| *spr0641* | *ctpA* | **0,21** | **0,30** | 0,72 | 1,68 | 1,58 | 0,93 | 1,26 | 1,15 | 0,75 |
| *spr0707* | *ciaR* | **34,99** | **32,17** | **20,09** | **24,85** | **20,13** | **26,02** | **0,38** | **0,26** | **48,74** |
| *spr0708* | *ciaH* | **13,71** | 12,68 | 10,91 | 9,85 | 23,76 | **9,77** | **0,44** | **0,33** | **9,81** |
| *spr0778* | *fruR* | 1,11 | 1,19 | 1,27 | 0,97 | 0,72 | **2,07** | 1,90 | 0,95 | 0,69 |
| *spr0782* | hypoth. | **5,15** | **5,15** | 2,81 | 4,04 | 4,08 | **5,92** | **0,27** | **0,41** | **6,92** |
| *spr0810* | hypoth. | 0,61 | 0,51 | **0,48** | 1,12 | 0,98 | 0,65 | 0,84 | **0,68** | 0,76 |
| *spr0825* | hypoth. | 1,17 | 1,02 | 1,04 | 1,50 | 1,62 | **0,27** | **1,97** | 1,02 | 0,61 |
| *spr0856* | *celA* | 0,84 | 0,97 | 2,53 | 7,04 | 6,50 | **0,07** | 1,66 | 1,93 | 0,57 |
| *spr0857* | *celB* | 0,87 | 1,09 | 1,73 | 2,73 | 3,14 | **0,05** | 2,05 | 1,05 | 0,66 |
| *spr0858* | hypoth. | 0,97 | 1,32 | 1,41 | 1,14 | 0,84 | **0,15** | 1,55 | **1,41** | **0,53** |
| *spr0859* | hypoth. | 1,14 | 1,08 | 1,28 | 1,16 | 0,89 | **0,18** | 1,65 | **1,18** | 0,51 |
| *spr0860* | hypoth. | 1,15 | 1,02 | 1,13 | 1,05 | 0,94 | **0,40** | 1,02 | 0,98 | 0,67 |
| *spr0866* | *pyrD* | **0,47** | 0,92 | 2,20 | 1,21 | 0,98 | 1,14 | 1,32 | **3,25** | 0,96 |
| *spr0881* | *coiA* | 1,08 | 1,40 | 2,41 | 5,56 | 4,95 | **0,09** | 1,70 | 1,21 | 0,75 |
| *spr0884* | *ppmA* | 2,19 | **2,34** | 1,76 | **1,53** | 1,60 | 1,34 | 0,58 | **0,36** | 2,30 |
| *spr0931* | hypoth. | **8,02** | **7,98** | **2,89** | 3,10 | 5,93 | **7,71** | **0,40** | **0,37** | **8,21** |
| *spr0996* | *radC* | | 1,37 | 2,30 | 4,16 | 1,14 | **0,22** | 2,00 | 1,02 | 0,40 |
| *spr1067* | *lacR* | 1,08 | 0,94 | 0,99 | 1,20 | 1,08 | **2,25** | 1,13 | 1,09 | 1,14 |
| *spr1069* | *lacG* | 1,09 | 0,57 | 0,47 | 0,71 | 0,83 | **4,82** | 1,03 | | 0,70 |
| *spr1070* | *lacE* | 0,98 | 0,45 | **0,55** | 0,66 | | **3,64** | 1,44 | 1,05 | **0,55** |
| *spr1071* | *lacF* | 0,65 | 0,47 | 0,63 | 0,75 | 1,05 | **3,99** | 1,39 | 1,17 | 0,45 |
| *spr1072* | *lacT* | 0,85 | 0,50 | **0,59** | 0,75 | | **4,13** | 1,23 | 1,50 | **0,57** |
| *spr1074* | *lacC* | 1,01 | 0,76 | 1,02 | 1,14 | 1,28 | **5,35** | 1,18 | 0,84 | 1,01 |
| *spr1144* | *Smf* | **0,76** | 1,10 | 1,91 | 0,97 | 3,14 | **0,05** | **2,40** | 1,30 | **0,34** |
| *spr1145* | *licC* | 1,22 | 1,27 | | 1,31 | 6,06 | 1,18 | 0,91 | 0,94 | 1,11 |
| *spr1146* | *licB* | 1,85 | 1,24 | **1,60** | 1,34 | 2,30 | **1,74** | 0,96 | **0,82** | **1,98** |
| *spr1147* | *pck* | 2,06 | 1,90 | 1,72 | 1,22 | 4,10 | **2,27** | 0,77 | **0,75** | 1,30 |
| *spr1148* | hypoth. | 2,08 | 2,01 | 1,90 | 1,34 | 4,62 | **2,66** | 0,82 | **0,74** | **1,97** |
| *spr1149* | hypoth. | 2,38 | **2,08** | **1,73** | 1,50 | 1,82 | **2,37** | 0,86 | **0,73** | 3,59 |
| *spr1153* | *carB* | **0,63** | 1,21 | 2,03 | 1,32 | 0,75 | 0,94 | 1,04 | **2,88** | 1,00 |
| *spr1154* | *carA* | 0,52 | 0,83 | 1,89 | 1,31 | 1,06 | 0,91 | 1,45 | **3,40** | 0,92 |
| *spr1155* | *pyrB* | **0,52** | **0,58** | 1,48 | 1,09 | 1,00 | 1,21 | **1,42** | **3,06** | 0,98 |
| *spr1156* | *pyrR* | 0,71 | **0,64** | 1,40 | 0,94 | 0,92 | 0,84 | 1,64 | **3,00** | 0,91 |
| *spr1191* | *appD* | 0,47 | 0,27 | 0,31 | 0,42 | 0,19 | 1,03 | 1,59 | 1,04 | 1,43 |
| *spr1289* | ABC-N/P | 0,46 | 0,54 | 0,25 | 0,20 | **0,19** | **0,34** | 2,61 | 1,09 | 0,42 |
| *spr1290* | ABC-N/P | 0,75 | 0,76 | 0,49 | 0,66 | 0,66 | **0,48** | 1,28 | 1,16 | 0,61 |
| *spr1291* | hypoth. | | | 0,34 | | | **0,36** | 1,85 | 1,19 | **0,38** |
| *spr1292* | hypoth. | 0,44 | **0,35** | **0,34** | 0,94 | 1,08 | **0,21** | 2,12 | 1,19 | **0,28** |
| *spr1293* | ABC-NBD | 0,84 | 0,65 | **0,32** | 0,39 | 0,78 | 0,52 | 1,66 | 0,76 | 0,51 |
| *spr1319* | hypoth. | 1,41 | 1,04 | 1,15 | 1,10 | 1,40 | 1,30 | **0,58** | **0,27** | 1,85 |
| *spr1320* | hypoth. | 1,25 | 1,22 | 1,20 | 0,93 | 1,25 | 1,28 | **0,64** | **0,32** | 1,85 |
| *spr1379* | ABC-MSP truncation | 1,05 | 1,20 | 1,12 | 0,94 | 1,02 | **0,36** | 1,30 | 1,38 | 0,60 |
| *spr1381* | ABC-MSP truncation | 1,08 | 1,04 | 1,24 | 0,94 | 1,05 | **0,40** | 0,99 | 1,21 | 0,64 |
| *spr1382* | *aliB* | 1,30 | 1,20 | 1,12 | 0,78 | 0,73 | **0,49** | 1,19 | 1,28 | **0,66** |
| *spr1538* | *Axe1* | 1,10 | 1,02 | 0,92 | 0,90 | 1,34 | 1,12 | 0,50 | **0,31** | 1,75 |
| *spr1546* | ABC-NBD | 1,78 | 1,28 | 1,19 | 1,03 | 1,31 | 1,08 | **2,78** | 1,20 | 1,18 |
| *spr1547* | hypoth. | 2,04 | 1,78 | 2,58 | 1,92 | 1,28 | 1,28 | **4,02** | 0,94 | 1,41 |
| *spr1548* | hypoth. | 2,08 | 1,71 | 3,05 | 2,80 | 2,12 | 1,20 | **4,31** | 1,05 | 1,45 |
| *spr1549* | hypoth. | 2,06 | 1,71 | 2,86 | 1,60 | 0,90 | 1,32 | **4,24** | 1,27 | 1,53 |
| *spr1566* | *scrA* | **0,42** | 1,01 | 0,79 | 0,99 | 1,04 | 1,54 | 0,76 | 1,04 | 0,99 |
| *spr1603* | hypoth. | 0,49 | 0,62 | 1,23 | 1,12 | 3,39 | 0,75 | 1,10 | **2,33** | 0,89 |

**Fortsetzung Tab. 6.3**

| | | KP1 (Cia$^{OFF}$) | | | | | | KP3 – KP1 | KP3 (Cia$^{ON}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CpH8 | | | | | THB | CpH8 | CpH8 | THB |
| Gennummer | Genname | N10 | N20 | N40 | N70 | N130 | N10 | N20 | N40 | N40 |
| *spr1628* | *pilD* | 0,89 | 0,90 | 1,78 | 3,70 | | **0,31** | 0,89 | 1,01 | 0,98 |
| *spr1668* | *galK* | 1,01 | 1,04 | 1,12 | 1,04 | 0,85 | **2,90** | 1,39 | 1,03 | 0,79 |
| *spr1724* | *ssbB* | 0,67 | 1,06 | 1,66 | 0,89 | 5,64 | **0,09** | **1,87** | **1,47** | 0,59 |
| *spr1747* | hypoth. | 0,87 | 0,96 | 1,13 | 1,20 | 1,12 | **0,42** | 1,61 | 1,04 | 1,11 |
| *spr1754* | *lytA* | 0,92 | 1,05 | 1,18 | 1,47 | 1,14 | **0,42** | 0,97 | 0,93 | 0,91 |
| *spr1755* | hypoth. | 0,92 | 1,09 | 1,38 | 1,68 | 1,40 | **0,38** | 1,80 | 0,97 | 0,98 |
| *spr1756* | *dinF* | **0,99** | 1,30 | 1,50 | 1,74 | 1,41 | **0,37** | 1,19 | **0,90** | 0,83 |
| *spr1757* | *recA* | 1,09 | 1,26 | 1,57 | 1,34 | 1,17 | **0,36** | 1,10 | **0,82** | 0,97 |
| *spr1758* | *cinA* | 0,79 | 1,04 | 1,35 | 2,55 | 2,23 | **0,17** | 1,39 | 1,04 | 0,84 |
| *spr1762* | hypoth. | 0,59 | 1,22 | 1,60 | 1,05 | 0,84 | **0,38** | 1,20 | 0,76 | 1,28 |
| *spr1786* | hypoth. | 1,13 | 1,15 | 1,76 | 3,65 | 3,14 | **0,21** | 1,58 | 1,08 | 0,76 |
| *spr1826* | hypoth. | 0,90 | 0,81 | 0,92 | 1,26 | 1,16 | **0,49** | 1,17 | **0,67** | 0,91 |
| *spr1829* | *nadC* | 0,94 | 0,92 | 1,06 | 1,59 | 1,50 | **0,38** | 1,62 | **0,73** | 1,04 |
| *spr1831* | hypoth. | 0,98 | 1,05 | 1,33 | 1,79 | 1,53 | **0,19** | 2,32 | 1,18 | 0,87 |
| *spr1856* | hypoth. | 0,81 | 1,43 | 2,54 | 2,26 | 2,12 | **0,07** | 1,25 | 1,38 | 0,88 |
| *spr1857* | hypoth. | 0,91 | 1,48 | 2,37 | 3,28 | 3,42 | **0,09** | 1,62 | 1,19 | 0,75 |
| *spr1858* | hypoth. | 1,05 | 1,11 | 1,96 | 3,81 | 3,97 | **0,07** | 1,16 | **1,58** | 0,96 |
| *spr1859* | hypoth. | 0,91 | 1,02 | 1,68 | 4,82 | 5,07 | **0,07** | 1,11 | **1,47** | 0,79 |
| *spr1861* | *cglD* | 1,02 | 1,21 | 2,18 | 2,53 | 2,87 | **0,06** | 1,29 | **1,52** | 0,93 |
| *spr1862* | *cglC* | 1,02 | 0,98 | 1,85 | 3,71 | 3,04 | **0,07** | 1,35 | **1,30** | 0,88 |
| *spr1863* | *cglB* | 0,85 | 1,30 | 2,76 | 4,53 | 5,28 | **0,08** | 1,68 | **1,62** | 1,03 |
| *spr1864* | *cglA* | 1,02 | 1,24 | 2,19 | 4,69 | 4,57 | **0,06** | 1,59 | 1,50 | 0,79 |
| *spr1873* | hypoth. | 0,86 | 1,24 | 1,13 | 1,29 | 1,12 | 1,27 | 0,74 | **0,44** | 1,21 |
| *spr1874* | *marR* | 0,63 | 1,08 | 1,10 | 1,20 | 0,97 | **1,53** | 0,79 | **0,45** | 1,40 |
| *spr1875* | hypoth. | 1,08 | 1,97 | 1,26 | 1,41 | 1,16 | 1,65 | 0,85 | **0,42** | 1,75 |
| *spr1913* | *rrmA* | 1,17 | 1,05 | 1,30 | 0,86 | 0,98 | 1,00 | **4,68** | 0,92 | 1,53 |
| *spr1916* | *malP* | **2,74** | **2,31** | 0,77 | **1,74** | **1,73** | **3,05** | **0,38** | **0,28** | **3,78** |
| *spr1917* | *malM* | **2,02** | 1,65 | 0,92 | 1,51 | 1,64 | **4,27** | **0,28** | **0,22** | **8,33** |
| *spr1936* | *tktC* | 1,47 | 1,56 | 1,13 | 1,18 | 0,85 | **3,73** | 1,40 | 0,76 | 1,15 |
| *spr1937* | *tktN* | 1,55 | 1,35 | 1,09 | 1,02 | 0,95 | **3,85** | 1,03 | 0,71 | **1,27** |
| *spr1938* | hypoth. | 1,47 | 1,35 | 1,18 | 1,26 | 0,97 | **4,85** | 1,18 | 0,67 | 1,45 |
| *spr1939* | hypoth. | 1,54 | 1,44 | 1,02 | 1,10 | 0,96 | **3,95** | 1,40 | 0,75 | 1,21 |
| *spr1940* | hypoth. | 1,34 | 1,41 | 1,32 | 1,27 | 1,04 | **3,72** | 1,11 | 0,76 | 1,42 |
| *spr1949* | hypoth. | | | | | | **4,39** | 0,72 | | 1,27 |
| *spr1951* | hypoth. | | | | | | **2,98** | 0,86 | | 1,08 |
| *spr1980* | *dltC* | 1,96 | 1,57 | 1,15 | 1,33 | 1,13 | **1,72** | 0,61 | **0,45** | **2,65** |
| *spr1981* | *dltB* | 1,74 | 1,58 | 1,56 | 0,97 | 1,20 | **1,92** | 0,66 | **0,45** | 2,18 |
| *spr1982* | *dltA* | 2,09 | 1,46 | 1,34 | 1,22 | **1,48** | **1,86** | 0,66 | **0,40** | 1,93 |
| *spr1987* | hypoth. | 0,50 | 0,48 | **0,43** | 0,60 | 0,58 | 1,33 | 0,46 | **0,51** | 1,18 |
| *spr1988* | *glpF* | 0,43 | 0,20 | **0,29** | 0,33 | 0,34 | 1,33 | 0,59 | **0,50** | 1,86 |
| *spr1989* | glpD-trunc. | 0,92 | 0,65 | 0,34 | 0,79 | 0,56 | 0,92 | 1,06 | 0,94 | 0,91 |
| *spr1990* | glpD-trunc. | 0,53 | 0,39 | **0,38** | 0,46 | 0,44 | 0,96 | **0,66** | **0,67** | 1,27 |
| *spr2003* | hypoth. | 1,27 | 1,54 | **1,52** | 1,13 | 0,90 | 0,92 | 1,03 | **2,07** | 1,02 |
| *spr2006* | *cbpD* | 0,82 | 1,41 | 2,33 | 5,35 | 4,79 | **0,06** | 1,55 | 1,16 | **0,58** |
| *spr2012* | *comFC* | 0,98 | 1,45 | 2,56 | 6,72 | 4,78 | **0,05** | 1,88 | 1,28 | 0,69 |
| *spr2013* | *comFA* | 0,61 | 1,32 | 2,47 | 3,18 | 4,99 | **0,09** | **1,58** | 0,95 | 0,69 |
| *spr2041* | *comE* | 0,74 | 1,14 | 2,56 | 2,51 | 1,24 | **0,10** | 1,23 | 1,53 | 0,74 |
| *spr2042* | *comD* | 0,60 | 0,90 | 1,77 | 5,04 | 2,57 | **0,04** | 1,53 | 1,14 | 0,61 |
| *spr2043* | *comC* | 0,52 | 0,84 | 2,15 | 3,91 | 2,26 | **0,03** | 1,12 | 0,84 | 0,71 |
| *spr2045* | *htrA* | **79,52** | **39,16** | **17,14** | **10,96** | **28,09** | **36,53** | **0,16** | **0,19** | **74,07** |
| *spr2046* | *spo0J* | **10,46** | **10,80** | 7,93 | **4,84** | **7,41** | **12,07** | **0,21** | **0,28** | **18,21** |

Dargestellt sind alle Gene, die zu einer Untersuchungsbedingung statistisch signifikant mehr als 2-fach unterschiedlich transkribiert wurden. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant.

**Tab. 6.4: Differentiell transkribierte Gene in spontanresistenten Labormutanten**

| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | C606 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *spr0013 spr1819* | 0,45 | **0,45** | 0,24 | **0,09** | **0,12** | **0,07** |
| *spr0020* | 0,47 | **0,69** | 0,09 | **0,05** | **0,04** | **0,03** |
| *spr0023* | 0,97 | 0,83 | 0,70 | **0,50** | 0,48 | 0,46 |
| *spr0024* | 0,92 | **0,79** | 0,70 | **0,49** | 0,56 | 0,40 |
| *spr0025* | 0,94 | **0,74** | 0,68 | **0,44** | **0,38** | **0,38** |
| *spr0030* | 0,36 | **0,50** | 0,15 | **0,08** | **0,11** | **0,07** |
| *spr0031* | 0,47 | **0,52** | 0,25 | **0,13** | **0,22** | **0,12** |
| *spr0040* | 2,78 | 1,41 | **0,20** | **0,17** | **0,10** | **0,10** |
| *spr0043* | 0,55 | **0,55** | 0,07 | **0,05** | **0,09** | **0,04** |
| *spr0045* | 1,04 | 1,30 | 0,93 | 1,01 | 0,33 | **13,24** |
| *spr0046* | | 1,57 | 0,74 | | 0,37 | **32,18** |
| *spr0047* | 1,19 | 1,41 | 0,78 | 0,89 | 0,41 | **32,50** |
| *spr0048* | 1,20 | 1,11 | 0,85 | 0,94 | 0,62 | **29,40** |
| *spr0049* | 0,85 | 0,77 | 0,43 | **0,29** | 0,38 | **11,86** |
| *spr0050* | 1,03 | 1,18 | 0,86 | 0,84 | 0,41 | **28,79** |
| *spr0051* | 0,86 | 1,00 | 0,87 | 0,90 | 0,80 | **36,92** |
| *spr0052* | 0,96 | 1,39 | 0,86 | 0,85 | 1,08 | **5,79** |
| *spr0053* | 0,96 | 1,37 | 0,90 | 1,02 | 0,91 | **12,76** |
| *spr0054* | 1,07 | 1,09 | 1,02 | 1,07 | 1,08 | **5,50** |
| *spr0055* | 1,02 | 0,97 | 0,98 | 1,01 | 1,06 | **6,05** |
| *spr0056* | 1,06 | 1,05 | 1,22 | 1,13 | 0,85 | **5,68** |
| *spr0059* | 0,88 | 0,75 | **0,55** | **0,48** | 0,66 | 0,46 |
| *spr0060* | 0,94 | **0,61** | **0,44** | **0,49** | 0,94 | 0,64 |
| *spr0061* | 0,94 | **0,58** | 0,52 | **0,50** | 0,69 | 0,57 |
| *spr0063* | 0,88 | **0,58** | 0,56 | **0,50** | 0,61 | 0,81 |
| *spr0064* | 1,02 | **0,55** | 0,68 | **0,43** | 0,94 | 0,82 |
| *spr0065* | 1,37 | **0,50** | 0,75 | **0,46** | 0,75 | 0,54 |
| *spr0080* | 0,76 | 0,81 | 1,23 | 1,01 | **2,33** | 1,38 |
| *spr0091* | 1,14 | 0,97 | 1,11 | 1,28 | **2,22** | 1,12 |
| *spr0096* | 0,72 | **0,40** | 1,23 | 0,74 | **2,38** | 0,62 |
| *spr0097* | 0,85 | 0,89 | 1,27 | **1,45** | **2,04** | **0,37** |
| *spr0098* | 0,63 | 0,86 | 0,70 | 0,85 | 1,08 | **0,02** |
| *spr0099* | 0,90 | 0,94 | 0,74 | 0,88 | 1,01 | **0,02** |
| *spr0101* | 0,88 | **1,49** | 1,12 | 1,59 | **2,27** | **0,30** |
| *spr0102* | 0,98 | **1,82** | 1,01 | **1,96** | **2,00** | **0,06** |
| *spr0103* | | 1,22 | 0,89 | 1,28 | **2,38** | **0,50** |
| *spr0104* | 0,93 | 1,07 | 1,24 | 1,47 | 1,18 | **0,39** |
| *spr0105* | 0,81 | **9,09** | **14,29** | **33,33** | **9,09** | **0,30** |
| *spr0106* | 1,02 | **10,00** | **16,67** | **50,00** | **14,29** | **0,34** |
| *spr0107* | 1,12 | **10,00** | **20,00** | **50,00** | **2,94** | 0,75 |
| *spr0108* | 0,98 | **1,75** | **3,70** | **5,00** | 1,28 | 0,74 |
| *spr0109* | | **3,33** | **4,76** | **6,25** | **7,14** | 0,46 |
| *spr0110* | 0,87 | 0,95 | 1,20 | **1,41** | **2,13** | **0,21** |
| *spr0111* | 0,88 | **1,18** | **1,59** | **2,86** | **1,47** | 0,81 |
| *spr0112* | 0,88 | 1,25 | **1,79** | **2,56** | 0,84 | 0,67 |
| *spr0113* | 1,14 | **1,28** | **1,54** | **2,63** | 1,15 | 0,97 |
| *spr0114* | 1,03 | 1,19 | **1,49** | **2,00** | 1,33 | 1,01 |
| *spr0127* | 0,55 | **0,41** | 0,04 | **0,02** | **0,01** | **0,01** |
| *spr0128* | 0,35 | **0,40** | 0,02 | **0,01** | **0,01** | **0,01** |
| *spr0141* | 0,82 | 1,71 | 1,35 | 1,96 | 1,55 | **2,21** |
| *spr0151* | 0,98 | **0,49** | 0,74 | 0,65 | 0,93 | 0,94 |
| *spr0168* | 1,19 | 1,22 | 1,19 | 1,20 | **2,33** | 1,74 |
| *spr0181* | 0,84 | 0,79 | 0,76 | **0,40** | **0,47** | **0,33** |
| *spr0251* | 0,67 | **0,61** | 0,40 | **0,26** | **0,49** | **0,35** |
| *spr0259* | 0,66 | **0,53** | 0,57 | **0,39** | **0,24** | **0,38** |
| *spr0260* | 0,78 | **0,52** | 0,53 | **0,43** | **0,32** | **0,46** |

| **Fortsetzung Tab. 6.4** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | C606 |
| *spr0261* | 0,78 | **0,43** | 0,51 | **0,39** | 0,31 | 0,57 |
| *spr0264* | 0,85 | 1,17 | 1,01 | 0,78 | 0,25 | **3,80** |
| *spr0265* | 1,03 | 1,28 | 0,94 | 1,02 | 0,46 | **3,84** |
| *spr0276* | 1,11 | **2,44** | **2,50** | **7,69** | **16,67** | **12,62** |
| *spr0277* | 1,16 | **2,70** | **2,50** | **11,11** | **16,67** | **13,06** |
| *spr0278* | 1,06 | **1,20** | 1,67 | **3,85** | **7,14** | **6,05** |
| *spr0279* | 1,12 | **1,25** | **1,72** | **5,26** | **10,00** | **7,59** |
| *spr0280* | 1,23 | **1,28** | **1,56** | **3,85** | **7,69** | **8,61** |
| *spr0281* | 1,14 | 1,45 | 1,25 | **5,56** | **7,14** | **7,81** |
| *spr0282* | 1,16 | 1,56 | 1,59 | **6,25** | **9,09** | **7,82** |
| *spr0286* | 0,66 | 0,84 | 0,88 | 1,32 | **2,27** | 0,90 |
| *spr0291* | 0,73 | 0,66 | 0,65 | 0,52 | 0,96 | **0,43** |
| *spr0296* | 0,77 | 0,92 | 1,18 | 1,14 | **2,70** | 1,03 |
| *spr0308* | 1,06 | 0,97 | 1,00 | **1,32** | **2,04** | 1,39 |
| *spr0311* | 1,20 | 1,27 | 1,18 | 1,59 | 1,92 | **2,49** |
| *spr0327* | 0,85 | 0,90 | 1,04 | 0,89 | 0,57 | **0,28** |
| *spr0357* | 1,39 | 0,98 | 1,54 | 1,37 | **2,08** | **2,20** |
| *spr0358* | | 1,75 | 1,77 | **2,86** | **4,17** | **3,12** |
| *spr0376* | 0,88 | 0,86 | 0,91 | 0,97 | **2,08** | 0,90 |
| *spr0388* | 0,91 | 1,20 | 0,36 | **0,23** | **0,17** | **0,14** |
| *spr0389* | 1,08 | 1,18 | 0,49 | **0,24** | **0,36** | **0,25** |
| *spr0404* | 0,77 | 1,82 | 1,45 | 1,87 | 0,81 | **2,05** |
| *spr0413* | 1,79 | 1,27 | **0,40** | **0,32** | **0,24** | **0,23** |
| *spr0444* | 0,79 | 1,06 | 1,15 | 1,10 | **0,43** | 0,99 |
| *spr0445* | **0,37** | 1,03 | 1,10 | 1,03 | 0,68 | 1,08 |
| *spr0446* | 1,41 | 0,86 | 1,30 | 0,91 | **0,38** | 1,43 |
| *spr0448* | **2,13** | 0,81 | 0,68 | 1,20 | 1,06 | 0,63 |
| *spr0452* | | 1,02 | 0,89 | 1,06 | 1,23 | **2,73** |
| *spr0453* | 1,09 | **0,62** | **0,34** | 0,54 | 0,33 | 0,54 |
| *spr0454* | 0,96 | 0,74 | **0,49** | 0,65 | 1,22 | 1,00 |
| *spr0461* | 2,33 | **1,82** | **0,28** | **0,22** | **0,18** | **0,16** |
| *spr0462* | 1,54 | 1,61 | 0,47 | **0,43** | **0,25** | **0,27** |
| *spr0463* | 1,67 | **1,96** | 0,43 | **0,51** | **0,36** | **0,30** |
| *spr0465* | 0,97 | 0,83 | 0,32 | **0,26** | **0,26** | **0,19** |
| *spr0466* | 1,09 | 1,05 | **0,34** | **0,35** | **0,23** | **0,29** |
| *spr0468* | 0,61 | 0,84 | 0,23 | **0,15** | **0,13** | **0,11** |
| *spr0469* | 0,58 | 0,81 | 0,08 | **0,06** | **0,16** | **0,13** |
| *spr0470* | 2,08 | 1,59 | **0,08** | **0,07** | **0,03** | **0,04** |
| *spr0471* | 2,04 | 1,72 | **0,07** | **0,06** | **0,20** | **0,29** |
| *spr0472* | 2,27 | 1,96 | **0,06** | **0,06** | **0,04** | **0,03** |
| *spr0473* | 2,38 | 2,08 | **0,14** | **0,12** | **0,08** | **0,08** |
| *spr0474* | 3,03 | 2,27 | **0,06** | **0,04** | **0,04** | **0,03** |
| *spr0484* | | 1,00 | 0,65 | 0,54 | 0,97 | **2,33** |
| *spr0504* | **0,37** | **0,50** | 0,89 | **0,60** | **0,33** | **0,43** |
| *spr0505* | **0,37** | **0,44** | 0,80 | **0,52** | 0,71 | 0,77 |
| *spr0506* | 0,42 | **0,45** | 0,93 | **0,54** | 0,70 | 0,66 |
| *spr0526* | | | | | **2,44** | 1,03 |
| *spr0542* | 1,39 | 1,06 | 1,04 | 1,39 | **3,33** | **2,80** |
| *spr0551* | 0,80 | 0,89 | 1,16 | 0,74 | 0,53 | **0,50** |
| *spr0565* | 1,05 | **0,51** | 0,79 | **0,45** | **0,66** | 0,63 |
| *spr0612* | | 1,02 | 0,95 | 0,96 | 1,28 | **2,23** |
| *spr0621* | 1,02 | 1,01 | 1,02 | 1,06 | **2,44** | 1,44 |
| *spr0622* | | 1,16 | 1,01 | 1,23 | **2,63** | 1,72 |
| *spr0690* | 0,82 | 0,71 | 0,60 | **0,38** | **0,30** | **0,30** |
| *spr0691* | 0,52 | 1,18 | 0,56 | 0,58 | 0,87 | **0,45** |
| *spr0707* | 1,23 | **1,39** | **1,72** | **2,70** | **6,67** | **4,96** |
| *spr0708* | 1,06 | **1,47** | **1,54** | **2,22** | **3,23** | **3,29** |

| **Fortsetzung Tab. 6.4** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | C606 |
| *spr0746* | 0,79 | **0,62** | 0,87 | 0,69 | **0,32** | 0,69 |
| *spr0775* | 0,98 | 0,95 | 1,09 | 0,88 | **0,46** | 0,64 |
| *spr0780* | 1,15 | 0,71 | 0,77 | **0,49** | 0,65 | **0,50** |
| *spr0782* | **2,38** | **1,56** | 1,59 | **2,56** | **10,00** | **5,03** |
| *spr0786* | 0,82 | **1,89** | 1,27 | **2,27** | 1,85 | **2,38** |
| *spr0788* | 0,76 | **2,04** | 1,19 | **2,33** | 1,20 | **2,19** |
| *spr0789* | 0,86 | 0,93 | 0,82 | 0,85 | **0,50** | 0,71 |
| *spr0798* | 1,11 | 1,20 | 1,41 | **2,17** | **2,08** | 1,61 |
| *spr0813* | 0,73 | 0,79 | 0,49 | **0,33** | 0,35 | 0,33 |
| *spr0825* | **1,92** | **3,03** | 0,76 | **0,58** | **0,46** | **0,50** |
| *spr0856* | 0,30 | **0,37** | 0,05 | **0,03** | **0,06** | **0,04** |
| *spr0857* | 0,43 | **0,50** | 0,10 | **0,05** | **0,04** | **0,03** |
| *spr0858* | 0,45 | **0,68** | 0,38 | **0,31** | **0,25** | **0,29** |
| *spr0859* | | 0,90 | 0,26 | **0,28** | **0,12** | **0,26** |
| *spr0881* | 0,34 | **0,40** | 0,11 | **0,06** | **0,07** | **0,04** |
| *spr0883* | 0,90 | 0,90 | 1,02 | 0,76 | **0,34** | **0,44** |
| *spr0884* | 1,09 | **0,83** | 1,27 | 1,10 | **2,56** | 1,79 |
| *spr0917* | 1,14 | 0,78 | 1,08 | 0,69 | **0,27** | **0,23** |
| *spr0920* | 0,85 | 0,71 | 0,94 | **0,49** | 0,74 | 0,56 |
| *spr0921* | 0,63 | 0,56 | 0,33 | **0,22** | 0,40 | **0,35** |
| *spr0931* | 2,13 | **1,45** | 1,37 | **1,92** | **4,76** | **3,45** |
| *spr0934* | 0,94 | **0,75** | 1,02 | 0,90 | **0,50** | 0,59 |
| *spr0935* | 1,11 | 1,16 | 1,20 | 0,88 | **0,45** | 0,53 |
| *spr0936* | 1,12 | 1,12 | 1,39 | 0,83 | **0,35** | 0,52 |
| *spr0939* | 1,00 | 1,26 | 1,29 | 0,98 | 0,40 | **0,43** |
| *spr0956* | | | | | **2,50** | |
| *spr0961* | | 0,98 | 1,12 | 1,43 | **2,22** | 3,03 |
| *spr0968* | 0,69 | 0,88 | 0,94 | 0,65 | **0,50** | 0,62 |
| *spr0996* | 0,46 | **0,44** | 0,30 | **0,23** | **0,14** | **0,14** |
| *spr1006* | 1,32 | 0,81 | 0,94 | 0,85 | **0,43** | 0,68 |
| *spr1017* | 0,88 | **0,68** | 0,81 | **0,55** | **0,43** | **0,43** |
| *spr1032* | 1,14 | **0,47** | 0,62 | 0,44 | 0,55 | 0,71 |
| *spr1040* | 0,92 | 1,10 | 0,93 | 1,05 | **0,45** | 0,81 |
| *spr1070* | **0,76** | **0,43** | **0,57** | **0,33** | **0,32** | **0,24** |
| *spr1071* | 0,67 | **0,43** | 0,67 | **0,57** | 0,89 | 0,73 |
| *spr1120* | 0,55 | 0,96 | 1,16 | 1,10 | 0,67 | **0,47** |
| *spr1121* | 0,57 | 1,11 | 1,15 | 1,29 | 0,58 | **0,44** |
| *spr1128* | 0,84 | 0,99 | 0,94 | 1,15 | 1,29 | **3,99** |
| *spr1144* | 0,26 | **0,32** | 0,05 | **0,02** | **0,03** | **0,02** |
| *spr1184* | | 1,10 | 0,93 | 1,02 | 1,36 | **6,44** |
| *spr1194* | 0,93 | 0,81 | 0,92 | 0,84 | **0,41** | 0,95 |
| *spr1255* | 0,90 | 1,11 | 0,69 | 0,81 | **0,48** | 0,70 |
| *spr1322* | 1,12 | 1,28 | 1,16 | **1,56** | **2,04** | 1,60 |
| *spr1343* | 1,11 | 1,49 | **2,70** | **3,23** | **1,61** | 1,13 |
| *spr1346* | 0,86 | **0,57** | 0,50 | **0,37** | **0,59** | **0,31** |
| *spr1359* | 1,06 | 1,22 | 1,14 | 0,99 | **0,43** | 0,51 |
| *spr1361* | 1,01 | 1,14 | 0,88 | 0,93 | **0,47** | 0,56 |
| *spr1365* | 0,96 | 0,96 | 1,22 | 0,91 | **0,45** | **0,36** |
| *spr1366* | 1,06 | 0,99 | 1,10 | 0,93 | **0,39** | **0,40** |
| *spr1379* | 0,67 | 1,72 | 0,71 | 1,14 | 1,03 | **2,27** |
| *spr1380* | **0,68** | **1,85** | **0,64** | 1,22 | 0,63 | 2,01 |
| *spr1381* | 0,68 | **1,72** | 0,72 | 1,30 | 0,93 | 2,32 |
| *spr1382* | 0,74 | 1,23 | 0,79 | 1,26 | 0,96 | **2,29** |
| *spr1407* | 0,88 | **0,71** | 1,22 | **0,70** | **0,47** | 0,53 |
| *spr1408* | **0,72** | **0,68** | 0,93 | **0,55** | **0,33** | **0,33** |
| *spr1423* | 0,99 | 1,03 | 0,82 | 0,77 | **0,40** | **0,38** |
| *spr1437* | 1,27 | 0,47 | 0,67 | 0,61 | 1,41 | **2,12** |

| **Fortsetzung Tab. 6.4** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | C606 |
| *spr1441* | 0,86 | 1,34 | 0,95 | 0,91 | 0,34 | **3,01** |
| *spr1452* | 0,71 | 0,68 | 0,62 | **0,46** | **0,35** | **0,30** |
| *spr1476* | 1,64 | 1,28 | 0,46 | **0,42** | 0,65 | 0,52 |
| *spr1512* | 1,18 | 1,09 | 1,05 | 1,05 | 0,96 | **2,43** |
| *spr1524* | 1,10 | **0,60** | 0,78 | **0,58** | **0,40** | 0,66 |
| *spr1525* | 1,02 | **0,52** | 0,67 | **0,46** | **0,64** | 0,79 |
| *spr1527* | 1,00 | **0,47** | 0,48 | 0,49 | **0,68** | 0,95 |
| *spr1538* | 1,19 | 1,23 | 0,96 | **1,45** | **3,45** | **2,84** |
| *spr1546* | 2,44 | 0,41 | 0,94 | 0,47 | **0,20** | **0,20** |
| *spr1547* | 3,33 | **0,45** | 1,23 | **0,50** | **0,09** | **0,11** |
| *spr1548* | 3,33 | **0,41** | 1,19 | **0,52** | **0,10** | **0,11** |
| *spr1549* | 2,56 | **0,50** | 1,10 | **0,54** | **0,12** | **0,12** |
| *spr1558* | 1,71 | 1,14 | 0,61 | 0,80 | 0,71 | **0,48** |
| *spr1561* | **1,20** | 0,98 | 0,90 | **0,56** | **0,33** | **0,46** |
| *spr1562* | 1,05 | 1,05 | 0,90 | **0,48** | **0,36** | **0,37** |
| *spr1574* | 0,77 | **0,62** | 0,60 | **0,40** | 1,14 | 1,02 |
| *spr1623* | 0,96 | 1,06 | 0,80 | 0,77 | 0,61 | **0,40** |
| *spr1624* | 0,90 | 1,14 | 0,77 | 0,75 | 0,46 | **0,35** |
| *spr1628* | 0,58 | 0,64 | 0,67 | **0,47** | 0,81 | 0,40 |
| *spr1647* | 0,88 | 1,17 | 0,90 | 1,25 | 1,55 | **2,09** |
| *spr1662* | 0,93 | 1,12 | 1,00 | 0,80 | **0,43** | 1,23 |
| *spr1663* | 1,02 | 1,19 | 0,91 | 0,93 | 0,26 | **4,81** |
| *spr1672* | | 1,00 | 1,00 | 1,25 | **3,23** | |
| *spr1674* | 0,90 | 0,93 | 1,27 | **1,59** | **2,17** | 1,23 |
| *spr1686* | | 1,14 | 1,02 | 1,16 | **2,44** | 0,98 |
| *spr1701* | 1,01 | 1,09 | 0,92 | 0,68 | 0,59 | **0,47** |
| *spr1710* | | 0,95 | 0,89 | 1,04 | **2,08** | 1,78 |
| *spr1724* | 0,43 | **0,42** | 0,07 | **0,04** | **0,04** | **0,03** |
| *spr1747* | 0,71 | 0,80 | 0,54 | **0,38** | **0,44** | **0,28** |
| *spr1754* | 0,90 | **0,66** | 0,70 | **0,40** | **0,56** | **0,23** |
| *spr1755* | 0,76 | 0,79 | 0,57 | **0,43** | **0,25** | **0,26** |
| *spr1756* | 0,67 | **0,65** | 0,51 | **0,31** | **0,20** | **0,41** |
| *spr1757* | 0,68 | **0,62** | 0,55 | **0,37** | 0,48 | **0,10** |
| *spr1758* | 0,51 | **0,51** | 0,20 | **0,10** | **0,10** | **0,23** |
| *spr1762* | 0,80 | 0,79 | 0,65 | **0,38** | **0,31** | **0,26** |
| *spr1766* | **0,27** | 0,87 | 0,67 | 0,62 | 0,68 | 0,76 |
| *spr1769* | **0,22** | 1,14 | 0,94 | 0,76 | 1,00 | 1,14 |
| *spr1770* | **0,24** | 1,11 | 1,11 | 0,79 | 0,83 | 1,02 |
| *spr1786* | 0,44 | **0,55** | 0,13 | **0,08** | **0,21** | **0,22** |
| *spr1800* | 0,96 | 1,35 | 0,88 | 1,23 | 0,79 | **3,99** |
| *spr1801* | 0,84 | 1,13 | 0,79 | 1,06 | 1,12 | **5,78** |
| *spr1802* | 0,88 | 1,28 | 0,98 | 1,17 | 1,12 | **4,24** |
| *spr1811* | 1,00 | 0,85 | 0,57 | 0,81 | **0,49** | **0,45** |
| *spr1823* | 1,03 | 0,96 | 1,09 | **0,33** | **0,44** | 0,69 |
| *spr1826* | 1,03 | 1,06 | 0,87 | **0,59** | **0,46** | **0,40** |
| *spr1829* | 0,70 | **0,81** | 0,69 | **0,38** | **0,29** | **0,23** |
| *spr1830* | 0,88 | 0,90 | 0,83 | 0,60 | 0,54 | **0,43** |
| *spr1831* | 0,58 | **0,61** | 0,37 | **0,19** | **0,14** | **0,11** |
| *spr1856* | 0,46 | **0,51** | 0,04 | **0,02** | **0,02** | **0,01** |
| *spr1857* | 0,44 | **0,52** | 0,07 | **0,03** | **0,03** | **0,02** |
| *spr1858* | 0,39 | **0,44** | 0,02 | **0,01** | **0,02** | **0,01** |
| *spr1859* | 0,36 | **0,47** | 0,03 | **0,01** | **0,02** | **0,01** |
| *spr1861* | 0,38 | **0,46** | 0,02 | **0,01** | **0,01** | **0,01** |
| *spr1862* | 0,40 | **0,47** | 0,06 | **0,03** | **0,20** | **0,19** |
| *spr1863* | 0,34 | **0,48** | 0,02 | **0,01** | **0,01** | **0,01** |
| *spr1864* | 0,30 | **0,45** | 0,02 | **0,01** | **0,02** | **0,01** |
| *spr1882* | 1,18 | 0,87 | 0,93 | 1,13 | 0,72 | **2,33** |

| **Fortsetzung Tab. 6.4** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gennummer | C103 | C203 | C303 | C403 | C503 | C606 |
| *spr1895* | 0,90 | **1,43** | **1,37** | **1,96** | **5,26** | **2,50** |
| *spr1896* | | 1,33 | 1,20 | 2,00 | **5,00** | 3,33 |
| *spr1897* | 0,84 | **1,32** | 1,11 | **1,75** | **5,00** | **3,09** |
| *spr1899* | 1,14 | 1,22 | 1,10 | 1,39 | **2,38** | 1,38 |
| *spr1912* | 0,79 | 0,99 | 0,79 | 0,92 | 0,90 | **0,47** |
| *spr1913* | 2,86 | 0,53 | 1,16 | 0,57 | **0,13** | **0,13** |
| *spr1916* | **1,75** | 1,22 | **1,59** | **2,33** | **4,55** | **3,68** |
| *spr1917* | **2,33** | **2,08** | **2,33** | **3,57** | **12,50** | **7,19** |
| *spr1932* | | 0,96 | 0,96 | 1,15 | **2,94** | |
| *spr1934* | 0,85 | 1,23 | 1,34 | 1,69 | 1,89 | **2,01** |
| *spr1936* | 1,61 | **1,52** | **1,82** | **2,27** | 1,43 | 1,96 |
| *spr1937* | 1,69 | **1,37** | **1,75** | **2,13** | **1,56** | **2,03** |
| *spr1938* | 1,69 | **1,54** | **1,79** | **2,04** | **1,49** | **2,04** |
| *spr1939* | 1,79 | **1,72** | **2,08** | **2,63** | 1,35 | 1,55 |
| *spr1940* | 1,69 | **1,54** | **2,13** | **2,44** | 1,35 | 1,62 |
| *spr1945* | 0,93 | 1,22 | 1,11 | 1,35 | **3,33** | 1,32 |
| *spr1951* | | | | 0,96 | **2,22** | 0,80 |
| *spr1952* | | 1,22 | 0,77 | 1,02 | **4,55** | |
| *spr1953* | 0,93 | 0,84 | 0,78 | 0,72 | **3,33** | 0,93 |
| *spr1964* | 1,03 | 0,72 | 0,73 | **0,58** | **2,22** | 1,11 |
| *spr1979* | 1,01 | 0,94 | 1,12 | 1,08 | **3,33** | 1,67 |
| *spr1980* | 1,22 | 1,37 | 1,25 | 1,27 | **3,33** | **2,47** |
| *spr1981* | 1,32 | 1,41 | 1,25 | **1,47** | **3,33** | **2,50** |
| *spr1982* | 1,11 | **1,19** | 1,05 | 1,30 | **2,27** | **2,16** |
| *spr1987* | 0,33 | **2,17** | **3,45** | **2,94** | 2,13 | 2,13 |
| *spr1988* | 0,37 | **2,70** | **2,94** | **2,86** | **2,04** | **2,29** |
| *spr1989* | 0,68 | 1,67 | 2,17 | **2,00** | 0,86 | 1,32 |
| *spr1990* | 0,61 | **1,54** | 1,72 | **1,79** | **2,38** | 1,49 |
| *spr1991* | **0,28** | **1,89** | 2,38 | **2,56** | **3,45** | 1,96 |
| *spr2006* | 0,23 | **0,40** | 0,04 | **0,02** | **0,03** | **0,01** |
| *spr2012* | 0,25 | **0,43** | 0,04 | **0,02** | **0,05** | **0,01** |
| *spr2013* | 0,38 | **0,45** | 0,23 | **0,12** | **0,14** | **0,09** |
| *spr2039* | 1,27 | 1,10 | 1,39 | 1,25 | **2,22** | 1,44 |
| *spr2041* | 0,63 | **0,42** | 0,15 | **0,09** | **0,14** | **0,18** |
| *spr2042* | 0,29 | **0,42** | 0,04 | **0,03** | **0,02** | **0,01** |
| *spr2043* | 0,25 | **0,31** | 0,03 | **0,01** | **0,02** | **0,01** |
| *spr2045* | 1,32 | **2,33** | **2,38** | **4,17** | **20,00** | **10,64** |
| *spr2046* | 1,23 | 1,79 | 1,85 | **2,56** | **11,11** | **5,74** |

Diese Tabelle gibt alle Gene wieder, die im Vergleich mit einer spontanresistenten Labormutante zum Untersuchungszeitpunkt (Nephelo 40) mehr als 2-fach signifikant unterschiedlich transkribiert wurden. **Fett** markierte Werte sind statistisch signifikant.

## …vielen Dank!

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die vielzähligen Anregungen und Ideen.

Herrn Prof. Dr. John A. Cullum für die Zweitkorrektur dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

PD Dr. Reinhold Brückner für die jahrelange Bürogemeinschaft und die „Zweitbetreuung“ dieser Arbeit.

Michael Nuhn für die Hilfe bei allen kleinen und großen und übergroßen Computerproblemen sowie der statistischen Auswertung von unzähligen Punkten.

Allen Laborkollegen, Leidensgenossen und Mitstreitern für die einzigartige Laboratmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und dem, was eine Doktorarbeit so unvergesslich macht.

Besonders meinen Eltern für den unumstößlichen Fels in der Brandung.

Ganz besonders meiner Frau Jutta für die vielen Überstunden der letzten Jahre, die ich im Labor und nicht bei Dir verbracht habe, sowie die mitfühlende Begleitung einer akademischen Geburt. Für Dich.

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| seit 2002 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Hakenbeck |
| 2000 – 2002 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie / Biotechnologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wohlleben |
| | Titel der Diplomarbeit: Biosynthese von (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin: Analyse des *dpgC*-Gens aus dem Balhimycin-Biosynthesecluster von *Amycolatopsis mediterranei* DSM 5908 |
| 1998 – 2002 | Hauptstudium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 1998 – 1996 | Grundstudium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster |
| 1987 – 1996 | Städtisches Gymnasium Ahlen (Westf.)<br>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |
| 1983 – 1987 | St. Martin Grundschule Ahlen (Westf.) |
| 16. Juni 1976 | geboren in Münster |