

Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*

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

von
Dipl.-Biol. Alexander Halfmann

Datum der wissenschaftlichen Aussprache
23.5.2008

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. M. Hahn
1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. R. Hakenbeck
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. J. A. Cullum
3. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. F. Götz

Kaiserslautern, 2008

D386

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, März 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
2.2	Zwei-Komponenten Systeme	5
2.3	Zwei-Komponenten Systeme in <i>S. pneumoniae</i>	12
2.4	Das Zwei-Komponenten System CiaRH von <i>S. pneumoniae</i>	15
2.5	Zielsetzung dieser Arbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Bakterienstämme	21
3.2	Plasmide	24
3.3	Oligonukleotide	26
3.4	Nährmedien	30
3.4.1	C-Medium (CpH8)	30
3.4.2	THY-Medium	31
3.4.3	D-Blutagar	31
3.4.4	LB-Medium	32
3.5	Anzuchtbedingungen und Konservierung von <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i>	32
3.5.1	Glycerinkulturen	32
3.5.2	Wachstum in Flüssigmedium	33
3.6	Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	33
3.6.1	Herstellung kompetenter Zellen	33
3.6.2	Transformation	34
3.7	Transformation von <i>E. coli</i>	34
3.7.1	Herstellung kompetenter Zellen	34
3.7.2	Transformation	35
3.8	Präparation genomischer DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	36
3.9	Präparation von RNA aus <i>S. pneumoniae</i>	37
3.10	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.11	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.12	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	42

3.13	Reaktion mit T4-DNA-Polymerase und Klenow-Fragment	42
3.14	Phosphorylierung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten	42
3.15	Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.16	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	43
3.17	Realtime RT-PCR	45
3.18	DNA-Sequenzierung	47
3.19	Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	48
3.20	Konstruktion von <i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A	50
3.21	Konstruktion von pPP2 und Konstruktion der Reporterplasmide	51
3.22	Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität	52
3.22.1	β -Galaktosidaseassay aus Flüssigkultur	52
3.22.2	β -Galaktosidaseassay mit Zellen von D-Blutagar	53
3.23	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.24	Überexpression und Aufreinigung von His ₆ -Proteinen	56
3.25	Bandshift Assays	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Konstruktion und Evaluierung des Promotor Probe Plasmids pPP2	60
4.2	Identifikation potentieller Promotoren mit CiaR-Bindestelle im Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6	64
4.3	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte potentiell <i>cia</i> -regulierter Gene	66
4.4	<i>In vivo</i> Analyse potentiell <i>cia</i> -regulierter Promotoren	79
4.5	Analyse der Expression <i>cia</i> -regulierter Gene mittels Realtime RT-PCR	83
4.6	Bindung von CiaR an <i>cia</i> -abhängige Promotoren	85
4.6.1	Überexpression von CiaR in <i>E. coli</i>	85
4.6.2	Bandshift Assays	86
4.7	Die Gene des CiaRH-Regulons	89
4.8	Aktivität CiaR abhängiger Promotoren unter verschiedenen Wachstums- bedingungen	90
4.8.1	Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in THY Medium	90
4.8.2	Aktivität CiaR abhängiger Promotoren auf D-Agar	91
4.9	Phosphorylierung des Response Regulators CiaR	93
4.9.1	Effekte des Aminosäureaustauschs D51A in CiaR	94
4.9.2	Einfluss der Histidinkinase CiaH auf die Expression <i>cia</i> -abhängiger Gene	97
4.9.3	Einfluss von Acetylphosphat auf die Aktivität von CiaR	98

4.9.4	Effekt der gleichzeitigen Inaktivierung der Gene <i>spxB</i> und <i>ciaH</i>	101
4.10	Veränderungen in der Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in <i>S. pneumoniae</i> R6, <i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> und <i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} während des Wachstums	103
5	Diskussion	107
5.1	Die Promotoren des CiaRH Regulons	107
5.2	Die Gene des CiaRH Regulons	111
5.3	Das CiaRH Regulon in der Gattung <i>Streptococcus</i>	120
5.4	Die Aktivierung von CiaRH	126
5.5	Ausblick	132
6	Literaturverzeichnis	133
	Publikationen	151
	Danksagungen	153
	Lebenslauf	155

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	NCBI	National Center for Biotechnology Information
Abb.	Abbildung	ng	Nanogramm
ADP	Adenosindiphosphat	nm	Nanometer
Asp	Aspartat	ONP	ortho-Nitrophenol
ATP	Adenosintri-phosphat	ONPG	ortho-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid
NaAc	Natriumacetat	P	Phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	p. A.	pro analysi
bp	Basenpaar	PAA	Polyacrylamid
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C	Cytosin	PBP	Penicillin-Bindeprotein
CBP	Cholin-Bindeprotein	PCR	Polymerasekettenreaktion
cDNA	copy DNA	pmol	Picomol
Cef	Cefotaxim	pPP	Pneumo Promoter Probe
CSP	competence stimulating peptide	pTP	Pneumo Translation Probe
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat	PTS	Phospho-Transferase System
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat	RBS	Ribosomenbindestelle
ddNTP	Didesoxynukleotidtri-phosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNase	Ribonuklease
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat	rpm	Rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RR	Responseregulator
DNase	Desoxyribonuklease	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat	SD	Sensordomäne
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat	SPDB	Solid Phase DNA Binding
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	sRNA	small RNA
G	Guanin	T	Thymin
g	SI Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)	Tab.	Tabelle
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	TCS	Zwei-Komponenten-System (two-component system)
His	Histidin	TE	Tris-EDTA
HK	Histidinkinase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
kb	Kilobasen	THB	Todd-Hewitt-Broth
KD	Kinasedomäne	T _m	Schmelztemperatur
kDa	Kilodalton	THY	Todd-Hewitt-Broth + Yeast
M	molar	UDP	Uridindiphosphat
MCS	multiple cloning site	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
min	Minute		
mg	Milligramm		
ml	Milliliter		
N	Beliebige Base		
N (Zahl)	Nephelo		

1 Zusammenfassung

Das Zwei-Komponenten System CiaRH beeinflusst die genetische Kompetenz, das Lyseverhalten, die Virulenz und die Resistenz gegen Cefotaxim von *S. pneumoniae*. Der entscheidende Einfluss von CiaRH für *S. pneumoniae* zeigt sich auch darin, dass in mehreren Transkriptomstudien eine große Zahl von Genen identifiziert wurde, die in Abhängigkeit des Zwei-Komponenten Systems transkribiert werden.

In dieser Arbeit konnten nun die Gene, deren Transkription direkt durch Bindung des Response Regulators CiaR in ihrem Promotorbereich reguliert wird, eindeutig definiert werden. Durch die Kombination von transkriptionellen Reporterfusionen in dem neu konstruierten Promoter Probe Plasmid pPP2, Bandshiftassays und Mutageneseexperimenten wurde als Bindestelle von CiaR ein Direct Repeat mit der Sequenz TTTAAG-N₅-TTTAAG identifiziert. Für 16 Promotoren mit dieser Bindestelle wurden eine Bindung von CiaR und eine CiaRH abhängige Expression nachgewiesen. Von den 16 Promotoren sind 15 positiv und nur einer negativ reguliert. Insgesamt besteht das CiaRH Regulon aus 30 Genen, wobei 19 Gene in 6 Operons organisiert sind. Zum CiaRH Regulon gehören *ciaRH* selbst, eine Vielzahl von Genen, die am Zellwandmetabolismus beteiligt sind (*lic1* Operon, *dlt* Operon), die Gene von fünf kleinen nicht-kodierenden RNAs (*ccnA-E*), die Stressprotease HtrA, das Chromosomensegregationsprotein ParB, die Peptidyl-Prolyl Isomerase PpmA, die Maltoseverwertungsgene *malMP*, das Phosphotransferasesystem ManLMN und mehrere Gene mit unbekannter Funktion. Die eindeutige Identifizierung der Gene des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH ermöglicht eine detaillierte Analyse der Zusammenhänge mit den *cia*-vermittelten Phänotypen.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde darauf eingegangen, welche Rolle die Histidinkinase CiaH spielt und woher das Phosphat für die Phosphorylierung des Response Regulators CiaR stammt. Es wurde durch Einbringen der Mutation D51A in CiaR gezeigt, dass das Aspartat an dieser Stelle des Proteins entscheidend für die Aktivität von CiaR als transkriptionellen Regulator ist. CiaH ist hingegen während des exponentiellen Wachstums in C-Medium für die Aktivität von CiaR verzichtbar. Die Promotoren des CiaRH Regulons zeigten in Abwesenheit der Kinase während dieser Wachstumsphase keine veränderte Aktivität. Die Phosphorylierung von CiaR muss daher auch über einen anderen Weg,

beispielsweise über Acetylphosphat, erfolgen können. Deshalb wurde auch der Einfluss der Inaktivierung von *spxB*, dem Gen für eine Pyruvatoxidase, welche die Synthese eines Großteils des zellulären Acetylphosphats in *S. pneumoniae* katalysiert, untersucht. Eine entscheidende Rolle wurde für CiaH bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt nur bei vorhandenem CiaH ein Anstieg der Aktivität der Promotoren des CiaRH Regulons stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass die Histidinkinase beim Übergang in die stationäre Phase ein Signal erhält, das die Aktivierung des CiaRH Regulons stimuliert. Möglicherweise können daraus Ansätze zur Identifizierung des bisher unbekanntes Signals von CiaH entwickelt werden.

2 Einleitung

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptokokken sind grampositive, anaerobe und aerotolerante Milchsäurebakterien, die zum Teil in langen Ketten wachsen und einen Zelldurchmesser von 0,5-1,5 μm haben. Sie besitzen einen niedrigem GC-Gehalt (ca. 40 %) und gehören innerhalb des Stammes der Firmicutes zur Klasse der Bacilli. Die Nährstoffanforderungen der Streptokokken sind sehr komplex. Das Hauptprodukt des homofermentativen Stoffwechsels ist Milchsäure. Ein weiteres Merkmal der Streptokokken ist das Hämolyseverhalten auf Blutagar. Die Art der Hämolyse ist dabei für bestimmte Arten innerhalb der Streptokokken typisch. *Streptococcus pyogenes* verursacht beispielsweise eine klare Hämolysezone, da die Erythrozyten komplett zerstört werden. Dieses Hämolyseverhalten wird als β -Hämolyse bezeichnet. Bei der α -Hämolyse wird dagegen das Hämoglobin der Erythrozyten reduziert, was zur Bildung einer grünlichen Zone um die Bakterienkolonien auf Blutagar führt. Ein solches Hämolyseverhalten zeigen unter anderem *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus pneumoniae wurde 1881 von Sternberg und Pasteur unabhängig voneinander erstmals beschrieben. Aufgrund seines häufigen Vorkommens in Paaren wurde dieses Bakterium auch lange Zeit als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet. Die große Bedeutung von *S. pneumoniae* für die Molekularbiologie nahm ihren Anfang in den 1920er Jahren, als Frederick Griffith das Prinzip der Transformation an diesem Organismus zeigte (Griffith, 1928). Er injizierte abgetötete, bekapselte Pneumokokken zusammen mit lebenden, unbekapselten und nicht pathogenen Pneumokokken in Mäuse. Die Mäuse starben und aus ihrem Blut konnten lebende, bekapselte Pneumokokken isoliert werden. Wurden diese wieder in Mäuse injiziert, führte dies wiederum zum Tod der Mäuse. Mit dieser Arbeit wurde bewiesen, dass eine aus den toten, bekapselten Pneumokokken stammende Substanz in die lebenden, unbekapselten Pneumokokken übertragen worden war, was diesen die Eigenschaft der Kapselbildung verlieh. Oswald Avery, Colin Macleod und Maclyn McCarty konnten einige Jahre später zeigen, dass die DNA die molekulare Grundlage des „transformierenden Prinzips“ ist (Avery *et al.*, 1944), da auf ihr die Information für die Kapselbildung gespeichert sein musste. Mit dieser Erkenntnis wurde die Grundlage für alle weiteren Arbeiten mit DNA gelegt.

Die Bedeutung von *S. pneumoniae* als Verursacher vieler Krankheiten wurde bereits bei seiner Entdeckung im 19. Jahrhundert erkannt. Auch heute noch ist *S. pneumoniae* einer der bedeutendsten Krankheitserreger und wird für jährlich über 1 Million Todesfälle weltweit verantwortlich gemacht (Klein, 1999). Bei den meisten Menschen kann er die Schleimhäute des Nasen- und Rachenraumes besiedeln, ohne dass es zu Symptomen einer Krankheit kommt. Ist das Immunsystem aber geschwächt oder noch nicht voll entwickelt, wie z.B. bei Kindern, älteren oder kranken Menschen, kann *S. pneumoniae* zu einem opportunistischen Krankheitserreger werden und Krankheiten wie Mittelohrentzündung, Lungenentzündung oder Meningitis auslösen (Mitchell, 2003). Eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren spielen dabei eine Rolle. Dazu zählen beispielsweise das Autolysin LytA, welches zur Lyse von *S. pneumoniae* führt und dadurch die Freisetzung anderer Virulenzfaktoren bedingt, das Cholin-bindende Protein A, welches zur Anheftung an Zellen genutzt wird, oder das Oberflächenprotein PspA, welches dem Schutz gegen das Komplementsystem des Wirtes dient (Jedrzejak, 2001). Jedoch stellt die Polysaccharidkapsel, welche Schutz vor Phagozytose durch das menschliche Immunsystem bietet, den wichtigsten Pathogenitätsfaktor dar. Durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Kapsel können Pneumokokken in Serotypen eingeteilt werden. Von den bisher unterschiedenen 90 Serotypen sind 23 für die meisten Infektionen beim Menschen verantwortlich (Klein, 1999; Martens *et al.*, 2004).

Zur Behandlung der durch *S. pneumoniae* verursachten Krankheiten eignen sich besonders β -Laktamantibiotika, zu denen Penicilline und Cephalosporine gehören. Diese Antibiotika binden an die für die Transpeptidierungsreaktion der Zellwandbiosynthese nötigen Enzyme, so dass keine Quervernetzung des Mureins stattfinden kann. Jedoch stellt die stetig ansteigende Penicillinresistenz ein Problem bei der Bekämpfung von *S. pneumoniae* dar. 1999 wies in den USA beispielsweise bereits etwa jedes dritte *S. pneumoniae* Isolat eine mittlere oder hohe Resistenz gegen Penicillin auf (Thornsberry, 1999; Jones *et al.*, 2004). Meistens sind Mutationen in den Zielstrukturen der β -Laktamantibiotika, den Penicillin bindenden Proteinen (PBPs), für die Resistenz verantwortlich. Bei der Selektion auf die β -Laktamantibiotika Cefotaxim und Piperacillin im Labor wurden aber auch die nicht-PBP Gene *cpoA* und *ciaH* bereits als Resistenzdeterminanten beschrieben (Hakenbeck *et al.*, 1999).

Bei der Identifizierung neuer Resistenzdeterminanten, aber auch bei der Identifikation neuer Ziele für Antibiotika oder neuer Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren, sowie bei der Entwicklung neuer Impfstoffe, können die in den letzten Jahren ermittelten Sequenzen mehrerer *S. pneumoniae* Stämme hilfreich sein. Bereits im Jahr 2001 wurden das 2038615 bp

große Genom des unbekapselten, nicht pathogenen Laborstammes *S. pneumoniae* R6 (Hoskins *et al.*, 2001) und das Genom des bekapselten, pathogenen Stammes *S. pneumoniae* TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) sequenziert. Seit 2007 ist auch die Sequenz des von Avery, Macleod und McCarty (1944) verwendeten bekapselten Stammes *S. pneumoniae* D39, von dem der Laborstamm R6 abstammt, verfügbar (Lanie *et al.*, 2007). Diese Genomsequenzen, ebenso wie die der nahe verwandten Streptokokken *S. oralis*, *S. mitis* und *S. sanguinis* (Regine Hakenbeck, unveröffentlicht; Xu *et al.*, 2007), stellen die Basis für ein detaillierteres molekulares Verständnis der Pathogenität und der Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* dar.

2.2 Zwei-Komponenten Systeme

Durch das Vorhandensein komplett sequenzierter Genome fällt es beispielsweise auch leichter, Zwei-Komponenten Systeme (two-component signal transduction systems, TCS) zu identifizieren, welche in vielen Organismen, auch in *S. pneumoniae*, eine Rolle bei der Pathogenität spielen (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006). Da diese nicht in Tieren vorkommen, bieten sie sich besonders als potentielle Ziele neuer Antibiotika an (Barrett und Hoch, 1998; West und Stock, 2001; Gilmour *et al.*, 2005). Ein genaueres Verständnis der Funktionsweise dieser Systeme ist daher von besonderem Interesse.

Die prinzipielle Funktionsweise eines typischen TCS besteht darin, dass eine in der Membran sitzende Histidinkinase einen Stimulus wahrnimmt und dieser über einen cytoplasmatischen Response Regulator in eine zelluläre Antwort umgewandelt wird. Bis vor einiger Zeit wurden Zwei-Komponenten Systeme nur in Eubakterien identifiziert. Jedoch wurden inzwischen auch einige TCS in Archaeobakterien und Eukaryoten, wie einigen Hefen, Pilzen und in *Arabidopsis thaliana* gefunden (Chang und Stewart, 1998; Stock *et al.*, 2000). Ein Bakterium hat durchschnittlich etwa 20 TCSs (Kiil *et al.*, 2005). Jedoch kann die Anzahl der Zwei-Komponenten Systeme sehr stark variieren. *Escherichia coli* besitzt beispielsweise 30 Gene für Histidinkinasen und 32 für Response Regulatoren (Mizuno, 1997), *S. pneumoniae* hat 13 komplette TCS und einen einzelnen Response Regulator (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000), *Mycoplasma genitalum* besitzt kein TCS (Fraser *et al.*, 1995). *Myxococcus xanthus* hingegen besitzt 272 Gene, die zu Zwei-Komponenten Systemen gehören (Shi *et al.*, 2008), *Streptomyces coelicolor* 164 (Bentley *et al.*, 2002). Die Anzahl der TCS eines Organismus

kann damit zusammenhängen, inwieweit sich der Organismus auf veränderte Bedingungen in seiner Umgebung einstellen muss. Muss ein Bakterium auf eine Vielzahl externer Reize, wie veränderte Ionenkonzentrationen, Trockenheit, Antibiotika oder die Anwesenheit einer bestimmten Anzahl von Artgenossen reagieren, so scheint es mehr TCS zu benötigen, um die externen Informationen in eine physiologische Antwort der Zelle umzusetzen. Da Mycoplasmen teilweise intrazellulär leben, verändert sich ihre Umgebung im Allgemeinen deutlich weniger als beispielsweise die von Streptomyceten, welche sich in ihrem Lebensraum im Boden ständig auf neue Bedingungen einstellen müssen und daher über eine besonders hohe Zahl von TCS verfügen.

Sowohl die Histidinkinase, als auch der Response Regulator eines Zwei-Komponenten Systems sind modular aufgebaut. Histidinkinasen sind meistens Membranproteine, die eine extrazelluläre Sensordomäne und eine cytoplasmatische Kinasedomäne besitzen (Abb. 2.1). Response Regulatoren sind cytoplasmatische Proteine, die gewöhnlich aus einer Receiverdomäne und einer Outputdomäne aufgebaut sind.

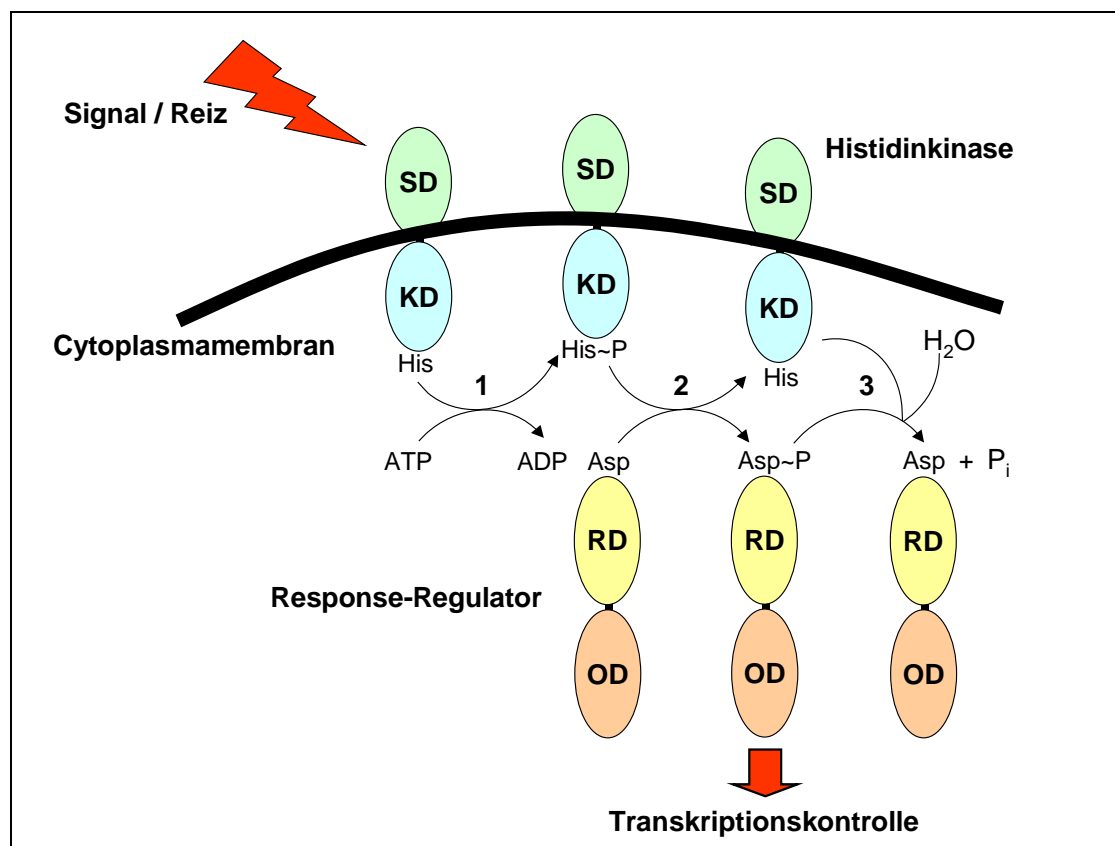


Abb. 2.1: Funktionsweise eines typischen signaltransduzierenden Zwei-Komponenten Systems. SD: Sensordomäne, KD: Kinasedomäne, RD: Receiverdomäne, OD: Outputdomäne. Zur Vereinfachung der Darstellung ist nur ein Monomer einer Histidinkinase gezeigt, obwohl funktionelle Histidinkinasen normalerweise als Dimer vorkommen (West und Stock, 2001).

Die in Abb. 2.1 dargestellte Funktionsweise eines prototypischen TCS lässt sich in drei Reaktionen einteilen (Stock *et al.*, 2000):

1. Autophosphorylierung $\text{HK-His} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Phosphotransfer-Reaktion $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \leftrightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Dephosphorylierung $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

Die ATP-abhängige Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der cytoplasmatischen C-terminalen Kinasedomäne findet statt, wenn die extrazelluläre N-terminale Sensor-Domäne der Histidinkinase (HK) ein Signal wahrnimmt. Der zur Histidinkinase gehörende Response Regulator (RR) katalysiert dann die Übertragung des Phosphatrestes auf einen konservierten Aspartatrest in seiner N-terminalen Receiver-Domäne. Dies führt zu einer Strukturveränderung des Response Regulators (Stock und Da Re, 2000), so dass er seine regulatorische Funktion, beispielsweise als Transkriptionsfaktor, ausführen kann. Bei der Dephosphorylierung, welche durch eine Phosphataseaktivität der Histidinkinase, eine Autophosphataseaktivität des Response Regulators selbst oder durch zusätzliche Phosphatasen katalysiert werden kann, wird die Phosphatgruppe in einer Hydrolysereaktion auf Wasser übertragen. Für alle diese Reaktionen werden zweiwertige Metallionen, insbesondere Mg^{2+} benötigt.

Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der geringen Stabilität der Histidin-Phosphat Verbindung und aufgrund des intrazellulären Verhältnisses von ATP zu ADP immer nur ein geringer Teil der Histidinkinasen in einem phosphorylierten Zustand vorliegt (Stock *et al.*, 2000). Daher scheint weniger die absolute Menge der phosphorylierten Histidinkinasen von Bedeutung zu sein, als vielmehr die Häufigkeit der Phosphorylierung. Für die Autophosphorylierung scheinen im allgemeinen zwei Moleküle einer Histidinkinase nötig zu sein, so dass die eine Histidinkinase die Phosphorylierung des Histidinrestes der anderen katalysiert (Surette *et al.*, 1996; Stock *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung einer Histidinkinase muss nicht notwendigerweise die Phosphorylierung des Response Regulators bedingen, sondern kann auch die Phosphataseaktivität der Histidinkinase verstärken, so dass die Phosphorylierung des Response Regulators herabgesetzt wird (Perego und Hoch, 1996; Stock *et al.*, 2000).

Die Phospho-Aspartat Verbindung des Response Regulators kann deutlich stabiler sein als die Phospho-Histidin Verbindung der Kinase. Ihre Lebensdauer kann von wenigen Sekunden bis zu Stunden oder sogar Tagen betragen (Stock *et al.*, 2000). Die durch die Phosphorylierung

ausgelösten Strukturveränderungen sind in ihrer Ausprägung von Regulator zu Regulator verschieden. Erst sie ermöglichen beispielsweise die Dimerisierung der Regulatoren und das Anlagern an die DNA und die RNA-Polymerase (Stock und Da Re, 2000), wobei die Phosphorylierung statt des „Anschaltens“ des Regulators auch ein „Abschalten“ bewirken kann (Stock *et al.*, 2000). Es wurde auch beobachtet, dass Response Regulatoren außer in den beiden Zuständen „an“ bei Phosphorylierung des Aspartats und „aus“ ohne Phosphorylierung, sich auch in einem intermediären Zustand befinden können, in dem zwar kein Phospho-Aspartat vorhanden ist, jedoch die Struktur des Proteins in Richtung der phosphorylierten Situation verschoben ist (Stock und Guhaniyogi, 2006).

Die große Vielfalt der Regulationsmöglichkeiten von Zwei-Komponenten Systemen ist vor allem durch den bereits erwähnten modularen Aufbau der Histidinkinasen und der Response Regulatoren möglich. Histidinkinasen sind aus einer C-terminalen Sensordomäne und einer N-terminalen Transmitterdomäne aufgebaut, welche durch eine Linkerregion verbunden sind (Mascher *et al.*, 2006b). Die Sensordomäne ist sehr variabel, wohingegen die Transmitterdomäne konserviert ist (Grebe und Stock, 1999). Letztere wird auch als Kinasedomäne bezeichnet, weil sich in ihr der Histidinrest befindet, welcher bei der Autophosphorylierung der Kinase phosphoryliert wird. Die Region, in der dieser Histidinrest liegt, wird als H-Box bezeichnet. Sie ist eine von sechs hoch konservierten Homologieboxen der Transmitterdomäne und stellt beispielsweise in der Histidinkinase EnvZ aus *E. coli* auch die Dimerisierungsdomäne dar (West und Stock, 2001). Die N-, D-, F- und G-Boxen spielen eine Rolle bei der ATP-Bindung und Hydrolyse (Grebe und Stock, 1999; West und Stock, 2001). Die X-Box ist vermutlich für die Struktur des Proteins bedeutsam. Durch Sequenzvergleiche dieser Boxen kann eine Klassifizierung der Histidinkinasen vorgenommen werden (Grebe und Stock, 1999). Jedoch werden dabei funktionelle Aspekte der Kinasen außer Acht gelassen, da die für den Empfang des Signals wesentliche Sensordomäne und die für die Weiterleitung des Signals wichtige Linkerdomäne (Stock *et al.*, 2000) nicht berücksichtigt werden. Daher bietet sich eine Klassifizierung, wie sie von Mascher *et al.* (2006b) vorgeschlagen wurde, mehr an. Dort wurden für die Klassifizierung von etwa 4500 bekannten Kinasen Kriterien wie die Struktur der Sensordomäne, die Membrantopologie und bekannte Daten der Signalperzeption herangezogen. Auf diese Weise konnten die meisten Histidinkinasen in eine von drei großen Gruppen eingeteilt werden. Die größte Gruppe beinhaltet Histidinkinasen mit einer von mindestens zwei Transmembranhelizes umgebenen extrazellulären Sensordomäne. Diese Histidinkinasen nehmen Signale im Periplasma oder im extrazellulären Raum wahr. Die Kinasedomäne dieser Histidinkinasen ist, wie bei den

anderen beiden Gruppen auch, cytoplasmatisch. Das außerhalb des Cytoplasmas wahrgenommene Signal muss somit über die Transmembrandomänen zur Kinasedomäne weitergeleitet werden. Zur Gruppe der Histidinkinasen mit extrazellulärer Sensordomäne gehört beispielsweise eine der am besten untersuchten Histidinkinasen, EnvZ aus *E. coli*. Die zweite große Gruppe der Histidinkinasen besitzt keine erkennbare extrazelluläre Inputdomäne. Vielmehr werden Signale innerhalb der Cytoplasmamembran von den Transmembranhelizes der Histidinkinase, eventuell in Verbindung mit kurzen extrazellulären Loops, wahrgenommen und an die Kinasedomäne weitergeleitet. Histidinkinasen dieser Gruppe erkennen beispielsweise mechanischen Stress innerhalb der Membran oder Veränderungen, die die Integrität der Zellhülle betreffen. Ein Vertreter dieser Gruppe ist z.B. LiaS aus *B. subtilis*. Auch die Histidinkinasen ComP aus *B. subtilis* und ComD aus *S. pneumoniae*, welche beide zu Quorum Sensing Systemen gehören und kleine Peptide detektieren, werden von Mascher *et al.* (2006b) in diese Gruppe eingeordnet. Im Gegensatz zu Histidinkinasen wie LiaS besitzen diese beiden jedoch durchaus extrazelluläre Bereiche, welche aber deutlich kürzer sind als bei Histidinkinasen wie EnvZ. Die dritte Gruppe bilden Histidinkinasen, die entweder in der Membran verankerte oder lösliche cytoplasmatische Proteine sein können. Sie nehmen intrazelluläre Signale wahr. Die drei großen Gruppen der Histidinkinasen können in weitere Untergruppen eingeteilt werden.

Ein gemeinsames Merkmal der Response Regulatoren ist die N-terminale Receiverdomäne (REC-Domäne), an der die Phosphorylierung des konservierten Aspartats stattfindet. Sie ist bei allen Response Regulatoren sehr ähnlich, weshalb sie sich auch nicht zur Klassifizierung der Response Regulatoren eignet (Galperin, 2006). Die REC-Domäne kann aber mit einer sehr großen Vielfalt von C-terminalen Outputdomänen kombiniert werden, was wiederum zu einer Vielzahl an Regulationsmöglichkeiten führt (Bourret, 2006). Für die Interaktion der beiden Domänen ist außerdem die verbindende Linkerregion von Bedeutung (Mattison *et al.*, 2002). Die Analyse von 4610 Response Regulatoren in 200 bakteriellen Genomen zeigte, dass etwa zwei Drittel aller Response Regulatoren eine DNA-bindende Outputdomäne besitzen und somit als transkriptionelle Regulatoren agieren (Galperin, 2006; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html). Die restlichen untersuchten Response Regulatoren besitzen entweder gar keine Outputdomäne oder die Outputdomäne hat eine enzymatische Funktion, bindet an RNA, Proteine oder andere Liganden. Von einigen Outputdomänen ist die genaue Funktion noch nicht bekannt. Die weitaus größte Gruppe innerhalb der Response Regulatoren stellen die Regulatoren der OmpR Familie dar. Ein Drittel aller Response Regulatoren gehören zu dieser Familie transkriptioneller Regulatoren (Galperin, 2006). Von

mehreren Mitgliedern der OmpR Familie ist bekannt, dass sie sowohl mit, als auch ohne Phosphorylierung des konservierten Aspartats in der Receiver Domäne dimerisieren, wobei die Phosphorylierung außer durch die zugehörige Histidinkinase auch durch „cross talk“ von anderen Histidinkinasen oder durch andere Phosphodonoren wie Acetylphosphat erfolgen kann (Laub und Goulian, 2007). Durch die Phosphorylierung scheint aber ihre aktive Konformation stabilisiert zu werden (Bachhawat und Stock, 2007). Auch für OmpR aus *E. coli* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung die Aktivität deutlich erhöht. OmpR bindet nach Phosphorylierung spezifischer an seine aus Repeat Sequenzen bestehende Bindestelle (Yoshida *et al.*, 2006). Dabei wurde beobachtet, dass DNA die Dimerbildung stimuliert und ein Molekül OmpR alleine nicht stabil an DNA bindet. Wie für die Regulatoren der OmpR Klasse typisch, bindet auch OmpR selbst an einen direkten Repeat auf der DNA (Martínez-Hackert und Stock, 1997). Der auch zur OmpR Familie gehörende Response Regulator PhoP aus *E. coli* beispielsweise bindet an zwei direkte Hexanukleotid Repeats, welche durch fünf Basen voneinander getrennt sind (Bachhawat und Stock, 2007). Die Bindestelle von PhoP liegt in den meisten von ihm regulierten Promotoren an Stelle der -35 Region. Weitere Beispiele für Regulatoren der OmpR Familie, die an Direct Repeats binden sind PhoP, ResD und YycF aus *Bacillus subtilis* (Liu und Hulett, 1997; Zhang und Hulett, 2000; Howell *et al.*, 2003). Die Größe, der Abstand und die Lage der Repeats ist aber innerhalb der OmpR Familie variabel (Martínez-Hackert und Stock, 1997). Jedoch lässt sich in den Regulatoren dieser Familie eine typische C-terminale DNA-bindende Domäne identifizieren. Diese besteht aus einer Erkennungshelix, in der sich für die Spezifität der DNA Bindung wesentliche Aminosäuren befinden, und aus zwei flankierenden Bereichen, welche auch mit der DNA interagieren (Martínez-Hackert und Stock, 1997; Kenney, 2002). Da diese Bereiche „wings“ genannt werden, geben sie dem DNA-bindenden Motiv von OmpR den Namen „winged-helix-turn-helix“. Der direkt vor der Erkennungshelix liegende Bereich der DNA-bindenden Domäne ist für die Interaktion der Regulatoren mit der α - oder σ - Untereinheit der RNA-Polymerase wesentlich (Martínez-Hackert und Stock, 1997; Kenney, 2002).

Bei der Vielzahl der verschiedenen Zwei-Komponenten Systeme und der dabei hohen Ähnlichkeiten der verschiedenen Domänen der Histidinkinasen und Response Regulatoren ist es bemerkenswert, dass die Signalübertragung von der Kinase zum dazugehörigen Regulator trotzdem mit sehr hoher Spezifität erfolgt. In *in vitro* Experimenten wird immer wieder gezeigt, dass ein Response Regulator durchaus von einer anderen als seiner zugehörigen Histidinkinase phosphoryliert werden kann. Ebenso kann eine Phosphorylierung durch kleine Phosphodonoren wie Acetylphosphat erfolgen. Jedoch werden diese Phosphorylierungen *in*

in vivo im allgemeinen durch die zum Response Regulator gehörende Histidinkinase wieder beseitigt (Laub und Goulian, 2007). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Histidinkinase ihren zugehörigen Response Regulator phosphorylieren kann und ihren Phosphatrest nicht über „cross-talk“ auf einen anderen Response Regulator überträgt, wird in der Zelle auch dadurch erhöht, dass oft deutlich mehr Moleküle des Response Regulators als der Histidinkinase vorhanden sind (Laub und Goulian, 2007). Die Histidinkinase EnvZ aus *E. coli* beispielsweise kommt in der Zelle im allgemeinen mit 100 Molekülen vor, wohingegen ihr Response Regulator OmpR etwa 3500 mal vorhanden ist (Cai und Inouye, 2002). Dieses Verhältnis von OmpR zu EnvZ wird zumindest teilweise darauf zurückgeführt, dass das Stoppcodon von *ompR* mit dem Startcodon von *envZ* überlappt. Diese Operonstruktur ist auch für die Gene vieler anderer Zwei-Komponenten Systeme typisch.

Auf der Ebene der Aminosäurezusammensetzung der Histidinkinasen und Response Regulatoren ist noch relativ wenig darüber bekannt, welche Aminosäuren genau für die Spezifität der Erkennung wesentlich sind. Es ist aber davon auszugehen, dass in der Histidinkinase ausschließlich die Transmitterdomäne, insbesondere die Region der H-Box, an der Erkennung des richtigen Response Regulators beteiligt ist (Laub und Goulian, 2007). In den Response Regulatoren ist vermutlich die Receiverdomäne, eventuell besonders die Region um das konservierte Aspartat, für die spezifische Erkennung der richtigen Histidinkinase verantwortlich. Jedoch existieren dazu noch sehr wenige Daten.

Der hier erläuterte Aufbau und die Funktionsweise von Zwei-Komponenten Systemen bezog sich weitgehend auf prototypische Systeme. Jedoch gibt es viele Abwandlungen von Zwei-Komponenten Systemen, die häufig viel komplexer sind. Zum einen besteht die Möglichkeit der „cross-regulation“, wobei eine Histidinkinase mehrere zugehörige Response Regulatoren hat („one-to-many“ Prinzip) oder mehrere Histidinkinasen einen Response Regulator phosphorylieren („many-to-one“ Prinzip) (Laub und Goulian, 2007). Auf diese Weise können mehrere regulatorische Effekte gleichzeitig durch ein Signal ausgelöst werden bzw. mehrere Signale können zu einer bestimmten Antwort in der Zelle führen. Eine weitere Möglichkeit zur Einbeziehung zusätzlicher Informationen in einen Signaltransduktionsweg stellen Phosphorelaysysteme dar (Stock *et al.*, 2000; Laub und Goulian, 2007). Diese Systeme sind komplexer aufgebaut als das prototypische Zwei-Komponenten System. In ihnen liegen zwischen der Übertragung des Phosphatrestes von der Transmitterdomäne der Histidinkinase zur Receiverdomäne des Response Regulators weitere Phosphotransferreaktionen. So kann die Histidinkinase eines solchen Systems ein Hybridmolekül sein, das C-terminal eine auf die

erste Transmitterdomäne folgende Receiverdomäne hat, von der der Phosphatrest nochmals auf eine zweite Transmitterdomäne innerhalb dieser Hybridkinase übertragen wird. In Phosphorelaysystemen können aber auch mehrere unabhängige Proteine im Phosphotransfer hintereinandergeschaltet sein. Dieser komplexere Aufbau der Phosphorelaysysteme erlaubt das Integrieren von mehr Informationen und somit ein „Finetuning“ der Signaltransduktion.

Eine einfachere, evolutionär vermutlich ältere Variante der Signaltransduktion stellen Ein-Komponenten Systeme dar (Ulrich *et al.*, 2005). Diese Systeme nehmen, wie auch Zwei-Komponenten Systeme, mit einer Inputdomäne Signale wahr und vermitteln mit ihrer Outputdomäne eine zelluläre Antwort. Die beiden Domänen bilden in Ein-Komponenten Systemen aber ein einzelnes cytoplasmatisches Protein ohne Kinase- und Receiverdomäne, so dass die für Zwei-Komponenten Systeme typischen Phosphorylierungsreaktionen fehlen. Ein-Komponenten Systeme scheinen in Bakterien noch häufiger und in einer größeren Vielfalt vorzukommen als Zwei-Komponenten Systeme, wobei auch der größte Teil der Ein-Komponenten Regulatoren auf transkriptioneller Ebene agiert.

2.3 Zwei-Komponenten Systeme in *S. pneumoniae*

S. pneumoniae besitzt 13 Zwei-Komponenten Systeme (TCS01-13) und einen einzelnen Response Regulator (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Die Regulatoren besitzen alle eine DNA-bindende Domäne und wirken daher als transkriptionelle Regulatoren (Lange *et al.*, 1999). Dabei gehören 8 von 14 Response Regulatoren zur OmpR-Familie. Für 10 Zwei-Komponenten Systeme und den einzelnen Response Regulator konnte eine Rolle in der Virulenz von *S. pneumoniae* nachgewiesen werden (Paterson *et al.*, 2006). Nur TCS03, TCS10 und TCS11 ließen keinen Einfluss auf die Virulenz erkennen. TCS03 weist Homologie zu dem für die Antwort auf Zellwandstress wichtigen Zwei-Komponenten System LiaRS aus *B. subtilis* auf (Mascher, 2006; Jordan *et al.*, 2007) und wird durch Vancomycin induziert (Haas *et al.*, 2005). TCS10 (*vncRS*) reguliert ein Operon, das für einen ABC-Transporter codiert (Robertson *et al.*, 2002; Novak *et al.*, 2000). Auch TCS11 reagiert auf Stress, der durch Vancomycin induziert wird (Haas *et al.*, 2005) und scheint an der generellen Erkennung von Stress an der Zellhülle beteiligt zu sein (Volz, 2008). Der einzige essentielle Response Regulator in *S. pneumoniae* gehört zu TCS02 (*vicRK*, *yycFG*). Dieses Zwei-Komponenten System ist an der Regulation von Genen, die für die Mureinbiosynthese

wesentlich sind, beteiligt (Ng *et al.*, 2005). Weitere TCS, deren Funktion in *S. pneumoniae* näher untersucht wurde, sind TCS04 und TCS06, welche beide die Expression von Genen der Zelloberfläche regulieren (McCluskey *et al.*, 2004; Ma und Zhang, 2007; Standish *et al.*, 2007), TCS08 und TCS09, welche verschiedene PTS Transporter regulieren (McKessar und Hakenbeck, 2007; Hendriksen *et al.* 2007), sowie TCS05 (*ciaRH*), TCS12 (*comDE*) und TCS13 (*blpRH*, *spiRH*). Von dem einzelnen Response Regulator, RitR, ist bekannt, dass er an der Kontrolle des Eisentransports beteiligt ist (Ulijasz *et al.*, 2004). TCS12 und TCS13, welches die Gene eines Bacteriocin Genclusters reguliert (de Saizieu *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2007), sind die einzigen Zwei-Komponenten Systeme von *S. pneumoniae* von denen die Signale bekannt sind, die zu ihrer Aktivierung führen. Die beiden Quorum Sensing Systeme erkennen kleine, sekretierte Peptide (Håvarstein *et al.* 1995; Reichmann und Hakenbeck, 2000).

Bisher wurden nur von fünf Response Regulatoren von *S. pneumoniae* die Bindestellen experimentell bestimmt. Dazu gehören die Regulatoren von TCS02 (Ng *et al.*, 2005), TCS06 (Ma und Zhang, 2007), TCS11 (Volz, 2008) sowie der einzelne Response Regulator RitR (Ulijasz *et al.*, 2004). Die erste identifizierte Bindestelle war die von ComE (Ween *et al.*, 1999), dem Response Regulator des für die Regulation der natürlichen Kompetenz von *S. pneumoniae* wesentlichen und inzwischen intensiv untersuchten Zwei-Komponenten Systems ComDE (TCS12).

Die ComE-Bindestelle ist in den Promotoren der frühen Kompetenzgene zu finden. Das ComDE Zwei-Komponenten System wird aktiviert, wenn sich bei einer bestimmten Zelldichte eine bestimmte Menge des Kompetenz-stimulierenden Peptids CSP (competence stimulating peptide; Håvarstein *et al.*, 1995) außerhalb der Zelle angesammelt hat. CSP ist das prozessierte Produkt des Gens *comC*, welches in einem Operon mit *comDE* transkribiert wird. Durch den ABC-Transporter ComAB wird das 17 Aminosäuren lange CSP aus der Zelle exportiert, wobei das 41 Aminosäuren lange *comC* Genprodukt an einem Doppelglycinmotiv gespalten wird (Claverys und Håvarstein, 2002). Als Teil eines Quorum sensing Systems aktiviert der von der Histidinkinase ComD phosphorylierte Response Regulator ComE ab einer bestimmten extrazellulären Menge CSP die Transkription der frühen Kompetenzgene. Dazu gehören *comCDE* und *comAB* selbst, *comM*, *comW*, sowie die identischen Gene *comX1* und *comX2* (Claverys *et al.*, 2007). Die höhere Expression der frühen Kompetenzgene führt zur verstärkten Expression der späten Kompetenzgene, wozu beispielsweise Gene für die DNA-Bindung an die Zelle, die DNA-Aufnahme, die DNA-Prozessierung und die

Rekombination gehören. Diese Gene besitzen Promotoren, welche eine veränderte -10 Region haben und eine „com-box“, an die der alternative σ -Faktor ComX bindet. Werden die späten Kompetenzgene exprimiert, so befindet sich die Zelle im Zustand der „Kompetenz“, d.h. sie ist dazu in der Lage, DNA aufzunehmen und durch homologe, RecA-vermittelte Rekombination in ihr Genom zu integrieren.

Etwa 70 der über 100 Gene des Kompetenzregulons sind jedoch für die genetische Transformation verzichtbar (Claverys und Håvarstein, 2007). Der ComX abhängige Zustand der Zelle scheint daher nicht nur die genetische Transformation zu ermöglichen, sondern er scheint vielmehr eine globale Stressantwort von *S. pneumoniae* zu sein, welche beispielsweise auch von sublethalen Antibiotikakonzentrationen ausgelöst werden kann (Prudhomme *et al.*, 2006). Deshalb wurde von Claverys *et al.* (2006) vorgeschlagen, anstatt des Begriffs Kompetenz den Begriff X-Zustand zu verwenden. In diesem physiologischen Zustand der Zelle werden vermehrt lytische Enzyme und das Bacteriocin CibAB exprimiert. Da Zellen im X-Zustand außerdem die Immunitätsfaktoren ComM und CibC exprimieren, sind sie gegen die durch diese Proteine verursachte Lyse geschützt. Andere Zellen, die sich nicht im X-Zustand befinden und damit auch nicht kompetent sind, besitzen keine Immunitätsfaktoren gegen Lyse. Somit verursachen die kompetenten Zellen die Lyse ihrer nicht kompetenten Artgenossen. Dieser Vorgang wird als Allolyse bezeichnet (Guiral *et al.*, 2005). Ein Teil einer Kultur mit genetisch identischen Zellen muss dabei ein anderes Genexpressionsmuster aufweisen als der andere Teil der Kultur. Welche Faktoren genau für diese Bistabilität, d.h. die Aufspaltung einer in sich genetisch identischen Kultur in Subpopulationen mit grundlegend unterschiedlichen Genexpressionsmustern (Dubnau und Losick, 2006), verantwortlich sind, ist aber noch unklar (Claverys *et al.*, 2007). Eine Rolle könnten unterschiedliche Pherotypen des CSPs sein, wenn zwei genetisch sehr ähnlich Populationen von *S. pneumoniae*, die aber verschiedene Abwandlungen von CSP produzieren, das selbe Habitat besiedeln und eine Subpopulation dabei schneller den X-Zustand erreicht als die andere. Der Sinn des dann stattfindenden „Brudermords“, d.h. dem Töten von nahe verwandten Artgenossen, könnte in diesem Zusammenhang darin bestehen, dass die DNA der lysierten Zellen zur Transformation zur Verfügung steht und somit die Ausbildung von genetischer Diversität begünstigt wird (Claverys und Håvarstein, 2007). Die durch den Zustand der genetischen Kompetenz verursachte Allolyse trägt aber auch zur Virulenz von *S. pneumoniae* bei, da dabei Virulenzfaktoren, insbesondere Pneumolysin, freigesetzt werden (Guiral *et al.*, 2005).

Eine Vielzahl von Faktoren haben Einfluss auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz von *S. pneumoniae*. Eine Rolle spielen beispielsweise die Konzentration des vorhandenen Sauerstoffs, die Anwesenheit von BSA oder der pH-Wert des Wachstumsmediums (Claverys und Håvarstein, 2002). Auch wird die natürliche Kompetenz von einer Vielzahl von Proteinen beeinflusst. Einige wenige davon sind beispielsweise die Pyruvatoxidase SpxB (Bättig und Mühlemann, 2008), LuxS (Romao *et al.*, 2006) und VicRK (TCS02) (Echenique und Trombe, 2001). Der wahrscheinlich deutlichste Effekt geht aber von dem Zwei-Komponenten System CiaRH aus.

2.4 Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *S. pneumoniae*

Bei der Untersuchung von im Labor isolierten Mutanten, die eine spontane Resistenz gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim entwickelt hatten, wurde festgestellt, dass in einigen Fällen Mutationen in dem Gen *ciaH*, welches für die Histidinkinase eines Zwei-Komponenten Systems codiert, für die Resistenz verantwortlich waren (Guenzi *et al.*, 1994). Damit war CiaRH nicht nur das erste Zwei-Komponenten System, das in *S. pneumoniae* identifiziert wurde, sondern auch die erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante gegen β -Laktamantibiotika (Guenzi *et al.*, 1994).

Die Histidinkinase CiaH besitzt eine extrazelluläre Inputdomäne und entspricht in ihrem Aufbau einer typischen Histidinkinase wie EnvZ aus *E. coli* (Zähler *et al.*, 2002). Der Response Regulator CiaR gehört zur OmpR Familie (Lange *et al.*, 1999), ist also ein transkriptioneller Regulator mit „winged helix-turn-helix“ DNA-bindendem Motiv. Die Gene des Zwei-Komponenten Systems werden als Operon transkribiert, wobei *ciaH* stromabwärts von *ciaR* liegt und beide Gene um acht Basenpaare überlappen (Abb. 2.2) (Giammarinaro *et al.*, 1999). Diese Operonstruktur mit Überlappung der Gene kommt häufig bei Zwei-Komponenten Systemen vor (Laub und Goulian, 2007).

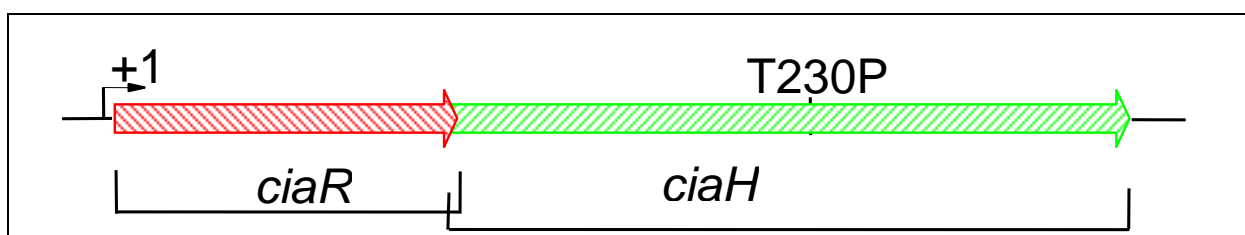


Abb. 2.2: Das Zwei-Komponenten System CiaRH. Die beiden Gene *ciaR* und *ciaH* überlappen um acht Basenpaare. Die Mutation T230P in CiaH (*ciaH*^{C306}) führt zu einem aktiveren CiaRH System. Das Transkript des Operons hat eine Länge von etwa 2 kb.

Außer in *Streptococcus pneumoniae* kommt das CiaRH Zwei-Komponenten System auch in anderen Streptokokken vor. Beispielsweise besitzen auch *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. pyogenes* und *S. thermophilus* ein solches TCS (Jordan *et al.*, 2008), ebenso wie *S. sanguinis*, *S. mitis* und *S. oralis*. In anderen Gattungen ist CiaRH aber nicht zu finden. Jedoch besteht eine Ähnlichkeit zu dem Zwei-Komponenten System LisRK aus *Listeria monocytogenes*, welches auch in Vertretern der Gattungen *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus* und *Enterococcus* vorkommt (Jordan *et al.*, 2008).

Im Rahmen der Untersuchungen von Guenzi *et al.* (1994) fiel vor allem eine Punktmutation in *ciaH* auf, welche zu einem Austausch von Threonin zu Prolin (T230P; *ciaH*^{C306}) in CiaH nahe dem konservierten Histidinrest führt. Es wurde gezeigt, dass diese Mutation alleine einen Anstieg der Cefotaximresistenz und den Verlust der natürlichen Kompetenz von *S. pneumoniae* bewirkt (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 1996). Von diesen beiden Phänotypen wurde der Name von CiaRH abgeleitet. Cia steht demnach für „competence induction and altered cefotaxime susceptibility“. Der Kompetenzverlust kann durch die Zugabe des Kompetenz-stimulierenden Peptids CSP zumindest teilweise wieder behoben werden (Zähler *et al.*, 2002). Der Einfluss von CiaRH auf die Kompetenz wird auch dadurch deutlich, dass durch die Inaktivierung von CiaR die Transformation in THB-Medium möglich wird, obwohl *S. pneumoniae* in diesem Medium normalerweise keine Kompetenz entwickelt (Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass der Kompetenzverlust durch die stärkere Aktivierung des CiaRH Systems ausgelöst wird, da man annimmt, dass die T230P Mutation in *ciaH*^{C306} zum Verlust der Phosphataseaktivität von CiaH und damit zu mehr phosphoryliertem CiaR führt (Guenzi *et al.*, 1994). Für die Weitergabe der von CiaRH ausgehenden Phänotypen ist jedenfalls ein funktioneller Response Regulator CiaR unverzichtbar (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 1996; Giammarinaro *et al.*, 1999). Das wird auch darin deutlich, dass die Inaktivierung von *ciaR* zu einer verminderten Virulenz von *S. pneumoniae* führt (Throup *et al.*, 2000; Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a). Die Inaktivierung von *ciaR* bewirkt außerdem eine schnellere Autolyse und macht *S. pneumoniae* empfindlicher gegenüber Zellwandinhibitoren wie Cycloserin, Bacitracin und Vancomycin (Mascher *et al.*, 2006a). Auch in Anwesenheit bestimmter PBP2x Mutationen bewirkt die Inaktivierung von *ciaR* ein deutlich verschlechtertes Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae* (Mascher *et al.*, 2006a).

Ein bestimmtes Signal, das zur Aktivierung des CiaRH Zwei-Komponenten Systems führt, konnte bislang nicht identifiziert werden. Es wurde beispielsweise diskutiert, dass ein

Zusammenhang der Aktivität von CiaRH mit der Ca²⁺-Konzentration bestehen könnte (Giammarinaro *et al.*, 1999). Eindeutig ist, dass Antibiotika wie Vancomycin und Penicillin, die in die Zellwandbiosynthese eingreifen, eine Aktivierung von CiaRH bewirken (Zähler *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007), und dass *S. pneumoniae* ohne funktionelles *cia*-System deutlich sensitiver auf eine Vielzahl von Lyse-induzierenden Faktoren reagiert (Mascher *et al.*, 2006a). Daher spielt die Histidinkinase CiaH vermutlich eine eher allgemeine Rolle als Sensor für Stress der Zellhülle, anstatt ein bestimmtes Signal zu detektieren (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2008).

In mehreren Transkriptomstudien wurde inzwischen eine Vielzahl von Genen identifiziert, die abhängig von CiaRH exprimiert werden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006). In Tab. 2.1 sind die Gene, für die von Sebert *et al.* (2002), Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004) eine CiaRH abhängige Expression festgestellt wurde, zusammengefasst. Es ist offensichtlich, dass zwischen den drei Studien Unstimmigkeiten bezüglich der identifizierten Gene bestehen. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Stämme von *S. pneumoniae*, verschiedene Wachstumsmedien und verschiedene Microarraytechniken verwendet wurden.

Tab. 2.1: CiaRH abhängige Gene, identifiziert in Transkriptomstudien.

Gen	Gen Nummer (<i>S. pneumoniae</i> R6)	Sebert <i>et al.</i> (2002)	Mascher <i>et al.</i> (2003)	Dagkessamanskaia <i>et al.</i> (2004)
<i>dnaA / dnaN</i>	spr0001-spr0002	-	-	+
	spr0072	+	-	-
<i>man</i>	spr0261-spr0259	-	+	+
hk03 / rr03	spr0343-spr0344	-	-	+
<i>trkH</i>	spr0426	+	-	-
	spr0505	+	-	-
<i>ciaRH</i>	spr0707-spr0708	+	+	+
<i>pepN</i>	spr0706	+	-	-
	spr0782	-	+	-
	spr0699	+	-	-
<i>parC</i>	spr0757	+	-	-
	spr0931	+	+	+
	spr0952	+	-	-
<i>lic</i>	spr1149-spr1143	+	+	-
	spr1215	+	-	-
<i>axe</i>	spr1538	-	+	+
<i>aldR</i>	spr1425	+	-	-
	spr1589	+	-	-
<i>cyl</i>	spr1768-spr1769	-	+	+
	spr1630	+	-	-
<i>mal</i>	spr1917-spr1916	+	+	+
<i>dlt</i>	spr1983-spr1979	-	+	+
	spr1826	+	-	-
<i>htrA / parB</i>	spr2045	+	+	+
<i>cbpD</i>	spr2006	+	-	-
Kompetenzregulon (>40 genes)		+	+	+

Gene, die in einer der Studien eine CiaRH abhängige Regulation zeigten, sind mit „+“ und rotem Hintergrund gekennzeichnet, Gene, die keine Abhängigkeit zeigten, sind mit „-“ und blauem Hintergrund markiert. Die Bezeichnungen der Gene entspricht der Annotation von *S. pneumoniae* R6 (Hoskins *et al.*, 2001).

Mascher *et al.* (2003) zeigten, dass sowohl in einer Mutante mit *ciaH*^{C306} Allel in C-Medium, als auch im Wildtypstamm in THB Medium das Kompetenzregulon eine niedrigere Expression aufweist, und dass in beiden Fällen CiaRH abhängig transkribierte Gene erhöht exprimiert werden, mit Ausnahme von *manLMN* und des *cyl* Clusters. Daher scheint tatsächlich der Verlust der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* in THB-Medium und in der Mutante mit *ciaH*^{C306} Allel in Zusammenhang mit der erhöhten Expression *cia*-regulierter Gene zu stehen.

In der Arbeit von Dagkessamanskaia *et al.* (2004) wurde das Transkriptom von Mutanten analysiert, die ein deletiertes *comC* Gen bzw. eine Deletion in *comC* und *ciaR* besaßen. Dabei wurde auch untersucht, wie sich das Transkriptionsprofil von *S. pneumoniae* verändert, wenn in den nicht kompetenten *comC* Mutanten die Kompetenz durch CSP induziert wird. Letztlich konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse von Mascher *et al.* (2003) weitgehend bestätigt werden und es wurde geschlussfolgert, dass CiaRH für die Zelle notwendig ist, um mit den Stress verursachenden Bedingungen der Kompetenz zurechtzukommen und um diesen Zustand verlassen zu können. Dieser Zusammenhang zwischen CiaRH und Kompetenz wird auch dadurch belegt, dass *ciaRH* eine verzögerte CSP-induzierte Expression zeigt (Peterson *et al.*, 2004).

Viele der von Mascher *et al.* (2003) und Dagkessamanskaia *et al.* (2004) als CiaRH abhängig exprimiert identifizierten Gene wurden auch von Sebert *et al.* (2002) beschrieben. Alle drei Arbeiten zeigten eindeutig, dass zwischen der veränderten Expression CiaRH abhängiger Gene und der Kompetenz ein Zusammenhang besteht. Ob dieser jedoch durch direkte oder indirekte Regulation von CiaRH erfolgt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es wurde jedoch vermutet, dass die Regulation indirekt erfolgen muss.

Eine offensichtliche Verbindung der regulierten Gene zu den von CiaRH abhängigen Phänotypen konnte bisher kaum hergestellt werden. Lediglich für *htrA*, welches für eine Stressprotease codiert, konnte eine entscheidende Rolle in der Virulenz und der Kompetenz eindeutig nachgewiesen werden (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a, b; Sebert *et al.*, 2005). Ibrahim *et al.* (2004a) berichteten, dass eine Deletion von *htrA* zu einer Abnahme der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* führt. Sebert *et al.* (2005) hingegen beobachteten, dass die Deletion von *htrA* in einem Stamm mit *ciaH*^{C306} Allel zu mehr Transformanten führt, im Wildtypstamm jedoch keinen Einfluss hat. Dabei wurde auch deutlich, dass verschiedene Konstrukte zur Inaktivierung von *htrA* zu verschiedenen Phänotypen führen. In einer weiteren

Arbeit, in der verschiedene *htrA* Deletionsmutanten analysiert wurden, konnte der unterschiedliche Einfluss verschiedener Konstrukte auf die Kompetenz bestätigt werden (Schäfer, 2007). Es wurde dabei gezeigt, dass der Einfluss von HtrA mit großer Wahrscheinlichkeit negativ ist.

Erste Hinweise darauf, welche Gene von CiaRH direkt, d.h. durch transkriptionelle Kontrolle von CiaR reguliert werden, lieferte ein genomweiter DNA-binde Assay (SPDB Assay; Mascher *et al.*, 2003). Dabei wurde eine Bindung von CiaR stromaufwärts der Gene *htrA*, *spr1149* (*lic*) und *manL*, die alle auch in mindestens zwei der beschriebenen Transkriptomstudien auftauchten (Tab. 2.1), festgestellt. Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte (Merai, 2003) ermöglichte die Identifizierung einer möglichen Bindestelle für CiaR in den Promotorbereichen der drei Gene. Bei der potentiellen Bindestelle handelt es sich um einen Direct Repeat mit der Konsensussequenz $5'(T/G)TT(A/G)AG-N_5-(T/A)TTAAG^3'$ (N = beliebige Base) (Halfmann, 2004). Die Bedeutung dieses Repeats für die Expression CiaRH abhängiger Gene muss jedoch noch eingehender untersucht werden.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Zwei-Komponenten System CiaRH übt in *S. pneumoniae* zum Teil gravierenden Einfluss auf die Kompetenz, die Virulenz, die Resistenz gegen Cefotaxim und die Lyse aus (Guenzi *et al.*, 1994; Throup *et al.*, 2000; Zähler *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a; Mascher *et al.*, 2006a). Eine Reihe von Transkriptomstudien identifizierte eine Vielzahl von Genen, die in Abhängigkeit von CiaRH exprimiert werden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006). Dabei blieb immer unklar, ob die Regulation dieser Gene direkt durch transkriptionelle Kontrolle von CiaR erfolgt oder ob die Regulation indirekt ist. In den Promotorregionen der Gene *htrA*, *spr1149 (lic)* und *manL*, welche wiederholt als *cia*-reguliert aufgetaucht waren, konnte eine Direct Repeat Sequenz identifiziert werden, welche die bisher unbekannte Bindestelle von CiaR darstellen könnte. Erste Experimente, in denen die entsprechenden Promotorfragmente mittels β -Galaktosidaseassays analysiert wurden, unterstützten die Vermutung, dass CiaR diese Promotoren direkt reguliert (Halfmann, 2004). In dieser Arbeit zeigte sich, dass das verwendete neu konstruierte Promotor Probe Plasmid pPP1 für verlässlichere Ergebnisse verbessert werden musste.

Daher soll in dieser Arbeit zunächst ein verbessertes Promotor Probe Plasmid konstruiert werden, um Promotorfragmente, welche eine potentielle CiaR Bindestelle enthalten, besser analysieren zu können. Die *in vivo* Analyse soll auch mit Fragmenten mit mutagenisierten potentiellen CiaR Bindestellen durchgeführt werden. Nachdem auch weitere potentielle CiaR regulierte Promotoren im Genom von *S. pneumoniae* R6 mittels bioinformatischer Suche identifiziert sind, sollen auch diese mittels β -Galaktosidaseassays auf ihre CiaR Abhängigkeit hin untersucht werden. Die so erhaltenen *in vivo* Daten sollen dann mit Bandshiftassays *in vitro* bestätigt werden, um nachzuweisen, dass CiaR tatsächlich direkt an die Direct Repeat Sequenz bindet. Auf diese Weise soll das Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH definiert werden.

Im Folgenden soll die Aktivität von CiaR-abhängigen Promotoren unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Außerdem werden die Vorgänge bei der Phosphorylierung von CiaR genauer untersucht. Insbesondere wird genauer auf die Rolle der Histidinkinase CiaH und des Phosphodonors Acetylphosphat eingegangen werden. In diesem Zusammenhang wird auch die Abhängigkeit der Expression CiaR abhängiger Promotoren von der Wachstumsphase untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

In Tab. 3.1 sind die *S. pneumoniae* Stämme aufgeführt, die als Ausgangsstämme für die in dieser Arbeit konstruierten Stämme in Tab. 3.2-3.6 dienten. Tab. 3.7 zeigt die verwendeten *E. coli* Stämme.

Tab. 3.1: Ausgangsstämme von *S. pneumoniae*

Bakterienstamm	Relevante Merkmale / Genotyp	Referenz
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	kapselfrei, kompetent	Avery <i>et al.</i> , 1944; Ottolenghi & Hotchkiss, 1962
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i>	<i>ciaR::aad9</i> , Spc ^R	Zähner, 1999
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i>	<i>ciaH::aad9</i> , Spc ^R	Zähner, 1999
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>}	nicht kompetent, CiaH T230P (<i>ciaH</i> A688C), Cef ^R	Guenzi <i>et al.</i> , 1994

Tab. 3.2: Derivate von *S. pneumoniae* R6

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnC</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnC}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnCΔG</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnCΔG}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnE</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnE}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnA</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnB</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnB}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ccnD</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ccnD}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>manL</i>	<i>bgaA::tetM-P_{manL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>manLΔ1</i>	<i>bgaA::tetM-P_{manLΔ1}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>manLΔ2</i>	<i>bgaA::tetM-P_{manLΔ2}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 <i>ciaR</i>	<i>bgaA::tetM-P_{ciaR}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr0782}	<i>bgaA::tetM-P_{spr0782}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{ppmA}	<i>bgaA::tetM-P_{ppmA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{mscL}	<i>bgaA::tetM-P_{mscL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr0931}	<i>bgaA::tetM-P_{spr0931}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr0959}	<i>bgaA::tetM-P_{spr0959}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr1149}	<i>bgaA::tetM-P1_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr1149ΔG}	<i>bgaA::tetM-P1_{spr1149ΔG}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr1149P2}	<i>bgaA::tetM-P2_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr1403}	<i>bgaA::tetM-P_{spr1403}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{axe}	<i>bgaA::tetM-P1_{axe}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{axeP2}	<i>bgaA::tetM-P2_{axe}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{spr1787}	<i>bgaA::tetM-P_{spr1787}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{malM}	<i>bgaA::tetM-P1_{malM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{malMP2}	<i>bgaA::tetM-P2_{malM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{arcA}	<i>bgaA::tetM-P_{arcA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{dltX}	<i>bgaA::tetM-P_{dltX}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{htrA}	<i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{vegW}	<i>bgaA::tetM-P_{vegW}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2 ^{vegM}	<i>bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PP2	<i>bgaA::tetM-lacZ</i>

Tab. 3.3: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit inaktiviertem *ciaR*

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnC</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnC}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnC</i> ΔG	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnC}ΔG-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnE</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnE}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnA</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnB</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnB}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ccnD</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnD}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>manL</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{manL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>manL</i> Δ1	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{manL}Δ1-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>manL</i> Δ2	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{manL}Δ2-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>ciaR</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ciaR}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr0782	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr0782}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2ppmA	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{ppmA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2mscL	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{mscL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr0931	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr0931}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr0959	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr0959}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr1149	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr1149ΔG	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1149}ΔG-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr1403	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1403}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>axe</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{axe}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2spr1787	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1787}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2malM	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{malM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>arcA</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{arcA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>dltX</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{dltX}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2vegW	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{vegW}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2vegM	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i> PP2	<i>ciaR::aad9, bgaA::tetM-lacZ</i>

Tab. 3.4: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit Aminosäureaustausch T230P in *ciaH*

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnC</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnC}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnC</i> ΔG	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnC}ΔG-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnE</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnE}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnA</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnB</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnB}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ccnD</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ccnD}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>manL</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{manL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>manL</i> Δ1	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{manL}Δ1-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>manL</i> Δ2	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{manL}Δ2-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>ciaR</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ciaR}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr0782	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr0782}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2ppmA	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{ppmA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2mscL	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{mscL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr0931	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr0931}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr0959	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr0959}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr1149	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr1149ΔG	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr1149}ΔG-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr1403	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr1403}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>axe</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{axe}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2spr1787	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{spr1787}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2malM	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{malM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>arcA</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{arcA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>dltX</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{dltX}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2vegW	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{vegW}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2vegM	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>} PP2	<i>ciaH</i> A688C, <i>bgaA::tetM-lacZ</i>

Tab. 3.5: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit inaktiviertem *ciaH*

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnC</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnC}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnE</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnE}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnB</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnB}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnD</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnD}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>manL</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{manL}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ciaR</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ciaR}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>spr0782</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{spr0782}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ppmA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ppmA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>spr0931</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{spr0931}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>spr1149</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>axe</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{axe}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>spr1787</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1787}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>malM</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{malM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>vegM</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-lacZ</i>

Tab. 3.6: Weitere Derivate von *S. pneumoniae* R6

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> R6 Str ^R (Volz, 2008)	Punktmutation in <i>rpsL</i> , Str ^R
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR</i> -Janus	Janus Kasette in <i>ciaR</i> , Str ^S
<i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A	<i>ciaR</i> A152C, Str ^R
<i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A PP2 <i>ccnC</i>	<i>ciaR</i> A152C, Str ^R , <i>bgaA::tetM-P_{ccnC}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A PP2 <i>spr0931</i>	<i>ciaR</i> A152C, Str ^R , <i>bgaA::tetM-P_{spr0931}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaR</i> A152C, Str ^R , <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 CiaRD51A PP2 <i>vegM</i>	<i>ciaR</i> A152C, Str ^R , <i>bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB</i>	<i>spxB::ermB</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB</i> PP2 <i>ccnA</i>	<i>spxB::ermB, bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB</i> PP2 <i>spr1149</i>	<i>spxB::ermB, bgaA::tetM-P_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>spxB::ermB, bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB</i> PP2 <i>vegM</i>	<i>spxB::ermB, bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnA</i>	<i>spxB::ermB, ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{ccnA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB ciaH::aad9</i> PP2 <i>spr1149</i>	<i>spxB::ermB, ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{spr1149}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB ciaH::aad9</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>spxB::ermB, ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>spxB::ermB ciaH::aad9</i> PP2 <i>vegM</i>	<i>spxB::ermB, ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>

Tab. 3.7: *E. coli* Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>supE44, Δ(lac)U169, (Φ80 lacZΔM15), endA1, gyrA46, hsdR17, recA1, relA1, thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA46, relA1, thi, Δ(lac-proAB), F⁺[traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZΔM15]</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> JM109 pQE30- <i>ciaR</i>	wie JM109, pQE30- <i>ciaR</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> JM109 pQE30- <i>ciaR</i> A152C	wie JM109, pQE30- <i>ciaR</i> A152C	Diese Arbeit

3.2 Plasmide

In Tab. 3.8 sind die verwendeten Plasmide bzw. Vektoren zusammengestellt, die unter anderem als Grundlage für die Konstruktion der Plasmide in Tab. 3.9 dienten.

Tab. 3.8: Vektoren und Plasmide

Plasmid / Vektor	Bemerkungen	Selektionsbedingungen	Referenz
pTP1htra	pTP1 Derivat; besitzt P_{htrA} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Halfmann, 2004
pPP1vegII	pPP1 Derivat; besitzt P_{vegII} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Halfmann, 2004
pQE30	Klonierungsvektor zur Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i> von His ₆ -tag	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>	Qiagen (Hilden)
pGEM-T Easy <i>spxB::ermB</i>	Zur Inaktivierung von <i>spxB</i> in <i>S. pneumoniae</i>	Erythromycin 2 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Bättig und Mühlemann, 2008
pUC19	Klonierungsvektor	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>	Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

Tab. 3.9: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Bemerkungen	Selektionsbedingungen
pTP2	GenBank Nr. EF061140	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2	GenBank Nr. EF061139	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnC	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnC} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnCΔG	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnCΔG} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnE	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnE} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnA	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnA} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnB	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnB} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ccnD	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ccnD} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2manL	pPP2 Derivat ; besitzt P _{manL} - <i>lacZ</i> Fusion	Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i> ; Selektion nur in <i>S. pneumoniae</i> möglich
pPP2 manLΔ1	pPP2 Derivat ; besitzt P _{manLΔ1} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2 manLΔ2	pPP2 Derivat ; besitzt P _{manLΔ2} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ciaR	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ciaR} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr0782	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr0782} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2ppmA	pPP2 Derivat ; besitzt P _{ppmA} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2mscL	pPP2 Derivat ; besitzt P _{mscL} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr0931	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr0931} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr0959	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr0959} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1149	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr1149} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1149ΔG	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr1149ΔG} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1149P2	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr1149P2} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1403	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr1403} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2axe	pPP2 Derivat ; besitzt P _{axe} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2axeP2	pPP2 Derivat ; besitzt P _{axeP2} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1787	pPP2 Derivat ; besitzt P _{spr1787} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2malM	pPP2 Derivat ; besitzt P _{malM} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2malMP2	pPP2 Derivat ; besitzt P _{malMP2} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2arcA	pPP2 Derivat ; besitzt P _{arcA} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2dltX	pPP2 Derivat ; besitzt P _{dltX} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2htrA	pPP2 Derivat ; besitzt P _{htrA} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2vegW	pPP2 Derivat ; besitzt P _{vegW} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2vegM	pPP2 Derivat ; besitzt P _{vegM} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pQE30-ciaR	pQE30 Derivat; <i>ciaR</i> kloniert <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>
pQE30-ciaR A152C	pQE30 Derivat; <i>ciaR</i> A152C kloniert <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>

3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg), Operon (Köln) und biomers.net (Ulm) bezogen. Oligonukleotid-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl in TE hergestellt, Gebrauchslösungen durch 1:10 Verdünnung der Stammlösung in H₂O. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert.

Die zur Konstruktion von pTP2, pPP2 und den Promotoren P_{vegW} und P_{vegM} verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3.10 aufgelistet. In Tab. 3.11 sind die Primer aufgeführt, welche zur Amplifikation der Promotorregionen von *cia*-Zielgenen verwendet wurden. Die amplifizierten Produkte wurden im Folgenden in die Vektoren pPP2 kloniert bzw. in Bandshiftassays eingesetzt. Die zur Überprüfung der Klonierungen und der Integration in das Genom von *S. pneumoniae* verwendeten Primer sind in Tab. 3.12 aufgeführt. In Tab. 3.12 sind auch die Primer aufgeführt, die zur Überprüfung der *cia*-Region der *S. pneumoniae* R6 Mutanten R6 *ciaR::aad9*, R6 *ciaH::aad9* und R6^{*ciaHC306*} verwendet wurden, sowie zur Überprüfung von *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB*. Die Oligonukleotide für 5'-RACE sind in Tab. 3.13, die Primer für Realtime RT-PCR in Tab. 3.14 aufgelistet. Primer für die Klonierung von *ciaR* in pQE30 sowie die zur Einführung der CiaRD51A Mutation in *S. pneumoniae* R6 verwendeten Primer sind in Tab. 3.15 aufgeführt.

Tab. 3.10: Oligonukleotide zur Konstruktion von pPP2 und den Promotoren P_{vegW} und P_{vegM}

Name	Sequenz (5'→3')
MCS neu1	<u>C</u> ATCGGTACCTGCGAATTCTAGTCTAGAAT <u>C</u> G
MCS neu2	<u>G</u> ATCCGATTCTAGACTAGAATTCGCAGGTACCGAT <u>G</u> CATG
PPPlacZ neu1	<u>G</u> ATCCTAACTAGTTAAGGAGGCAAATATGAAACATCTT
PPPlacZ neu2	<u>G</u> ATCAAGATGTTTCATATTTGCCTCCTTAACTAGTTAG
Eco seq fwd	GCATTTATCAGGGTTATTGTCTC
Eco seq rev	GCAACACCTGCAATTGGATG
veg5	CGAT <u>G</u> CATG <u>C</u> TTGGACTCCTGTTGATAGATCC
vegW	CGCGGATCCAGCTTGCAAATTATATCAACGTTAATAAGACGTTGTC
vegM	CGCGGATCCAGTTTGCAAATTATATCATATTAATAAGACGTTGTC

Angefügte *SphI*, *BamHI* und *BglIII* Restriktionsschnittstellen bzw. -überhänge sind unterstrichen.

Tab.3.11: Oligonukleotide zur Amplifikation der Promotorregionen von *cia*-Zielgenen

Name	Sequenz (5'→3')
ccnC_for	GCGGCATGCGCGCGTAACTATGTTCGTCG
ccnC_rev	GCGGGATCCCTAACCGTCTATAGTATACCCG
ccnC_mut1	GCGGGATCCCTAACCGTCTATAGTATACCCGACCTATTTTAAACAAATTTTAA AAATCTC
ccnE_for	GCGGCATGCCTGTGCGACTTCATCTCTCGC
ccnE_rev	GCGGGATCCCTTAATGATTATAGTATACACATC
ccnA_for	GCGGCATGCGCTTCTATCGTTCTATGGGC
ccnA_rev	GCGGGATCCCTTAATGACTATATAACTAGACCATC
ccnB_for	GCGGCATGCTGCGTGGTGAGGTGCTGG
ccnB_rev	GCGGGATCCCTTAATAACTACATGATACAAGAC
ccnD_for	GCGGCATGCGAATGGAATCTATCAAACACG
ccnD_rev	GCGGGATCCCTTATGAACTTAGTGTACTC
manL_for	GCGGCATGCTCAAGATTACTACTCAAAAATC
manL_rev	GCGGGATCCGTTTTTCATTTAAGAAAATTTAAGACTG
manL_del1	GCGGGATCCACTTTAAGACTGTTTAAGTATAAAC
manL_del2	GCGGGATCCACTGTTTAAGTATAAACCGTTTTTC
ciaR_for	GCGGCATGCTACGGAATGCATAAATAAGCC
ciaR_rev	GCGGGATCCCTATTAATAACTATTATACCAAATTTG
spr0782_for	GCGGCATGCCCTCTATTGTATCATGAAACGG
spr0782_rev	GCGGGATCCGATTATGATTTATTATACTCTGTTTC
spr0884_for	GCGGCATGCAGATGGTATTCTCATGCTTCG
spr0884_rev	GCGGGATCCCTACTCTATCTATTTTACTATTTTTTC
spr0915_for	GCGGCATGCCATCAATTATATCTTGAGCAAGG
spr0915_rev2	GCGGGATCCGTGTTTCGTGTTTCATTGTATCC
spr0931_for	GCGGCATGCCTAGACAGGTACGACTTAACC
spr0931_rev	GCGGGATCCCTACTTCTTTAGAGTAATATATCTATC
spr0959_fwd	GCGGCATGCACGAGATAAGGATAAAGTATCC
spr0959_rev	GCGGGATCCCTCACGAACGGTATCTCATTTTTTC
spr1149_for	GCGGCATGCAGAAATGAAGGGCAGTAAGTC
spr1149_rev	GCGGGATCCCTAGAGTCCTTCAGAATAATATAC
spr1149_mut1	GCGGGATCCCTAGAGTCCTTCAGAATAATATACTTTCTTTAAAGAAAATTTAA AAC
1149f2	GCGGCATGCTACAGAATTCCTAGTCATTACTAG
1149r4	GCGGGATCCCTATTCTCTCTATTATACCAC
spr1403_for	GCGGCATGCATTTCCCTCCATAATTCATTATATC
spr1403_rev	GCGGGATCCCTGAACAATAATATATTCTGTTTTTG
spr1538_for	GCGGCATGCCATGATTGCCCTTCATCTGG
spr1538_rev	GCGGGATCCCTGATGACTTTAGTATAAGAGCC
spr1538-fwd2	GCGGCATGCCAGAAGAGAGAGCGAAATGC
spr1538-rev2	GCGGGATCCATCGTTACCACAACCTGTAGCAT
spr1787_for	GCGGCATGCGACCAGTTGGTCCATATTAGC
spr1787_rev	GCGGGATCCACATCTTTCCCTTGATTATAAC
spr1917_for	GCGGCATGCGAATAGCAAGTTTTATTGATAAGG
spr1917_rev	GCGGGATCCAAATGCAAATTTATGCTATCAAATC
Pmal_fwd	GCGGCATGCCGTGAGAGTCAAACCTTAGG
Pmal_rev1	GCGGGATCCCGTATTTTGCAGACGCAAACG
spr1955_for	GCGGCATGCGTGATAACCAGATGATAATTGG
spr1955_rev	GCGGGATCCCTAGGATGGAATATATATATACAAATG
dlt_fwd1	GCGGCATGCGAGTTTTGAAGCAGGATCACTC
dlt_rev1	GCGGGATCCGCTTATTTTTCTACCATTGTACC
spr2045_for	GCGGCATGCTCACAATTTCAAAGAGTTATCC
spr2045_rev	GCGGGATCCCTGAATTACTGAAAGTATAAACTG

Angefügte *SphI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tab. 3.12: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierungen in pPP2, zur Bestätigung der korrekten Integration von pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae* und zur Amplifizierung der *cia*- und *spxB*-Regionen

Name	Sequenz (5'→3')
EII_fwd_Kontr	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_Kontr	TATCTTTCACGGGCATATAACGATGC
MCS_fwd_Kontr	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274-lac	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG
lacZ_fwd_Kontr	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
bgaA_rev_Kontr	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC
4989	CGGGATCCATAAAAAATCTTATTGGTTGAGG
4991	CCCAAGCTTAATCGTTGTATCACTATCAAATCC
4994	CGGGATCCAGTCTTTATACTTCCGTGGACG
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
ciaH_for	TCGGTTGTCGAAGTCTATGTTTCAAAAGTC
ciaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
ciaRdown_r	CACATCCATAATGGTAGCTTCTGGCTTACG
ciaHdown_r	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAGC
ciaR int fwd	CCTTGACTTATGGGAATATCG
ciaR int rev	CGATATTCCCATAAGTCAAGG
spxB-f2	GTCAGCATAAATATGATACAGTGG
spxB-r2	CAAGTCAGCACAGACTTGGG

Tab. 3.13: Oligonukleotide für 5'-RACE

Name	Sequenz (5'→3')
5' RACE-Adapter (RNA)	GAUAUGC GCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA
ciaR_RT_RACE	GACACCACTCTCAGCTTCG
ciaR_RACE_3'	CTCTCAGCTTCGTAGAGACC
spr0782-RT_RACE	CCAAGGCGTTCATAATCGTG
spr0782-RACE_3'	GATACTTGCGGTAATCAAGCC
spr0884_RACE_3'_2	TCTGACCCTTTCGAACAAGC
spr0884_RT_RACE_2	CATGCTGATAAGGTCTGCTCC
spr0931-RACE_3'	GTCTTCAGATAGGGAAGAACC
spr0931-RT_RACE	CAGATAGGGAAGAACCTAG
spr0959_RACE_3'	GTCTGATTAAGGTCTTACCC
spr0959_RT_RACE	GGCTATCGTTGCTCAATTGTC
spr1149-RACE_3'	GCATGAGAAACCCAGTCTCC
spr1149-RT_RACE	GATACGTTCTTATAAAGAGG
spr1403-RACE_3'	CTGCACCAAAGTAATACTTACG
spr1403-RT_RACE	GCAAGACACTAGCTGCACC
spr1538-RT_RACE	CATCAAAGTCTTCCGGAACC
spr1538-RACE_3'	CTCATCCCTTCTCTATAGG
spr1787-RT_RACE	CAACCAGAGACCCCCTGC
spr1787-RACE_3'	CCAAGTACTGAGACTGAAAGAC
spr1917-RT_RACE	GACCAAATGATCCGATTC
spr1917-RACE_3'	CGATTCCGTAAGCTCCTGG
spr1955-RT_RACE	CAAGTTTTCTAACTCCTTGCC
spr1955-RACE_3'	CTCCTTGCCGGACGGTG
htrA_RT_RACE	GGCAGTTTGTGTAATAGTAC
htrA_RACE_3'	GTTAGAGTTGTTTACACTAC
lacZ_RT_RACE	GGGCGATCGGTGCGGG
lacZ_RACE_3'	GCCTCTTCGCTATTACGCC
RACE PCR 5'	GATATGCGCGAATTCCTG

Tab. 3.14: Oligonukleotide für Realtime RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')
RT782f	AAACACCAGTCCAACCTAAAGAG
RT782r	TTTACTTGAAGCAGGAGTAGAAGAG
RT884f	GCAGGTATGACTCTTGAAACAC
RT884r	TGATTTGAGCCGTTACATCTGG
RT931f	TGGGCTACAATGCCTCAAC
RT931r	CAAGTGGCGATTTGTCACC
RT1149f	GTTTCATGGAGACTGGGTTTC
RT1149r	CGGACGATAAGCATCAATGG
RT2045f	GTAGCCCGTTAGGTTCTGAATATG
RT2045r	CCAGAGTTACCTGGGTTAATAGC
RTgyrAf	TATCACAGCAGTACGTGATGAG
RTgyrAr	GGATAGCGAGCATATTGAAACC

Tab. 3.15: Oligonukleotide für die Klonierung von *ciaR* und für die Konstruktion von *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A

Name	Sequenz (5'→3')
<i>ciaR</i> - <i>Bam</i> HI	G <u>CGGATCC</u> ATGATAAAAAATCTTATTGGTTGAGG
<i>ciaR</i> - <i>Sal</i> I	G <u>CGTCGACTT</u> ACTGAACATCTTTTAAAAGATACC
pQE seq fwd	TAGGCGTATCACGAGGCC
pQE seq rev	GTTCTTTACGATGCCATTGGG
janus_f	CCTATCCAGAGGAAATGGATCGGATCCG
janus_r	GGGCCCTTTCTTATGCTTTTGGACG
ciaRup_f	ATTGATGAAGGAACGGATGCTGAAACAGCC
ciaRup_r_kan	CGGATCCGATCCATTTCTCTGGAATAGGATTTGACAGACCTAGGTCATCCTCAACC
ciaRdown_f-rps	CGTCCAAAAGCATAAGGAAAGGGGCCACTTTTGCAGAGAATTTGCAAACCTTGCG
ciaRdown_r	CACATCCATAATGGTAGCTTCTGGCTTACG
cia_P1-2	GAATTGGTTTCGTCAGCTGGC
cia_P_2	GGCAACATCAAAGCCAGCAAAAATCAAGTCATAGACACC
cia_P_3	GGTGTCTATGACTTGATTTTGGCTGGCTTTGATGTTGCC
ciaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC

Angefügte *Sal*I und *Bam*HI Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

3.4 Nährmedien

3.4.1 C-Medium (CpH8)

Für das Wachstum von *S. pneumoniae* wurde in dieser Arbeit soweit nicht anders angegeben das semisynthetische Komplettmedium CpH8 (nach Lacks & Hotchkiss, 1960) verwendet. Die in Tab. 3.16 aufgeführten Einzelkomponenten wurden kurz vor Verwendung des Mediums steril zusammenpipettiert. Die Zusammensetzung der Einzelkomponenten ist in Tab. 3.17 und 3.18 beschrieben.

Tab 3.16: Zusammensetzung des C-Mediums

Komponente	Menge
PreC	400 ml
Supplement	13 ml
Glutamin (1 mg/ml)	10 ml
AdamsIII	10 ml
2 % Pyruvat	5 ml
Phosphatpuffer (pH 8)	15 ml
5 % Hefeextrakt	9 ml

Tab. 3.17: Einzelkomponenten des C-Mediums

Komponente	Menge
PreC	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	0,05 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,5 einstellen mit NaOH, 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, Supplement steril zusammenpipettieren	
AdamsIII	
AdamsI	160 ml
AdamsII	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
0,1 M CaCl ₂	1,6 ml
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	
Phosphatpuffer, pH 8	
1 M KH ₂ PO ₄	53 ml
1 M K ₂ HPO ₄	947 ml
autoklavieren	

Tab. 3.18: Zusätze der Einzelkomponenten des C-Mediums

Komponente	Menge
3 in 1 Salts	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
0,1 M MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,2 ml
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren	
AdamsI	
Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCL (B ₆)	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCL	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	
AdamsII	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl _{konz.}	10 ml
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	

3.4.2 THY-Medium

Alternativ zu C-Medium wurde auch THY-Medium verwendet. Dieses setzt sich zusammen aus THB-Medium (Becton Dickinson), welches nach Angaben des Herstellers angesetzt wurde, und nach dem Autoklavieren zugegebenem Hefeextrakt (25 %; Endkonzentration in THY-Medium 0,5 %).

3.4.3 D-Blutagar

Als Festmedium für *S. pneumoniae* wurde D-Agar (Tab. 3.19) mit 3 % (v/v) Schafsblut (Oxoid GmbH, Wesel) verwendet. Das Blut wurde dem autoklavierten D-Agar zugesetzt, nachdem dieser auf 50°C abgekühlt war. Bei Bedarf wurden Antibiotika (Tab. 3.20) in den benötigten Konzentrationen zugegeben.

Tab. 3.19: D-Agar

Komponente	Menge
Glukose	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	20 g
H ₂ O	ad 1 l

Tab. 3.20: Verwendete Antibiotika zur Selektion von *S. pneumoniae*

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
Cefotaxim	H ₂ O	10 mg/ml
Erythromycin	EtOH p.a., 50 %	10 mg/ml
Kanamycin	H ₂ O	10 mg/ml
Streptomycin	H ₂ O	10 mg/ml
Spectinomycin	H ₂ O	50 mg/ml
Tetracyclin	EtOH p.a., 70 %	5 mg/ml

3.4.4 LB-Medium

E. coli wurde in LB-Medium (Tab. 3.21) angezogen, welchem bei Bedarf Antibiotika in den benötigten Konzentrationen zugegeben wurden. Als Festmedium wurde LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar verwendet.

Tab. 3.21: LB-Medium

Komponente	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

autoklavieren

3.5 Anzuchtbedingungen und Konservierung von *S. pneumoniae* und *E. coli*

3.5.1 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen zur dauerhaften Konservierung von Stämmen wurden angelegt, indem Aliquots von Kulturen 1:5 mit Glycerin (99,5 %) gemischt wurden und aufgeteilt in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert wurden. Die Glycerinkulturen wurden auf D-Blutagar bzw. LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert, um die Reinheit der Kulturen zu überprüfen. Aufgetaute Glycerinkulturen wurden im Allgemeinen verworfen und nicht wieder eingefroren.

3.5.2 Wachstum in Flüssigmedium

Von *S. pneumoniae* Stämmen wurden im Allgemeinen Vorkulturen mit 100 µl Glycerinkultur in 6 ml C-Medium angeimpft. Befanden sich diese in der exponentiellen Wachstumsphase, wurde in einer Verdünnung von mindestens 1:20 vorgewärmtes C-Medium angeimpft und weiter bei 37°C inkubiert. Die Wachstumsmessung erfolgte mit einem Nephelometer (Digital Univalvo DS29, Diffusion Systems, London). Dabei wurde die Lichtstreuung der Zellen (Nephelo, N) gemessen.

E. coli wurde in LB-Medium schüttelnd bei 37°C angezogen. Es wurde entweder aus einer flüssigen Vorkultur oder mit Kolonien von einer Agarplatte angeimpft. Die Wachstumsmessung von *E. coli* erfolgte bei einer optischen Dichte von 600 nm in einem Photometer.

Die Berechnung der Wachstumsrate μ bzw. der Generationszeit g erfolgte im linearen Bereich (exponentielle Wachstumsphase) der halblogarithmisch aufgetragenen Wachstumskurve nach der Formel:

$$\mu = (\ln X - \ln X_0) / (t - t_0) [\text{min}^{-1}]$$

$$g = \ln 2 / \mu [\text{min}]$$

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t , X_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 , $(t - t_0)$ = Zeitdifferenz [min]

3.6 Transformation von *S. pneumoniae*

3.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Da Pneumokokken natürlich kompetente Bakterien sind, sind sie in einer Phase ihres Wachstums dazu in der Lage DNA aufzunehmen. Die maximale Kompetenz wird in der midexponentiellen Phase erreicht.

Daher wurden zur Transformation Glycerinkulturen (s. 3.5.1) gewöhnlich bei einer Zelldichte von etwa $N=30-35$ (maximale Kompetenzphase von *S. pneumoniae* R6) angelegt. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde den Kulturen teilweise BSA zugegeben (Endkonzentration 0,072 %). Meistens wurde darauf jedoch verzichtet, da auch ohne BSA-Zugabe im Allgemeinen eine ausreichend hohe Zahl an Transformanten erhalten wurde und BSA im Kulturmedium die Messung der Zelldichte verfälschen kann.

3.6.2 Transformation

Zur Transformation wurden 200 µl Glycerinkultur von *S. pneumoniae* auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3 - 10 µl zu transformierender DNA wurden die Transformationsansätze zur Aufnahme der DNA für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Danach folgte die phänotypische Expression der Resistenz für 2 h bei 37°C im Wasserbad. Je 100 µl der Ansätze wurden unverdünnt und in 1:10 Verdünnung (in 0,9 % NaCl) auf D-Blutagar mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte für maximal zwei Tage. Einzelkolonien von Transformanten wurden stets auf dieselben zur Selektion verwendeten Platten ausgestrichen.

Zur Transformation der nicht kompetenten Mutante *S. pneumoniae* R6_{ciaHC306} wurden den Transformationsansätzen 2 µl CSP (competence stimulating peptide; 10 ng/µl; Endkonzentration 100 ng/ml) zugesetzt, da dieses Peptid die Kompetenz induziert (Hårvarstein *et al.*, 1995).

3.7 Transformation von *E. coli*

3.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Da *E. coli* nicht natürlich kompetent ist, müssen die Zellen vor der Transformation einer speziellen Behandlung unterzogen werden. Dabei stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit eine vereinfachte Methode, basierend auf Hanahan (Hanahan, 1983), angewendet wurde.

Dazu wurden 200 ml LB-Medium mit Kolonien von LB-Platten angeimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde durch das Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt (UltrospecIII Spectrophotometer, Pharmacia). Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur zum schnellen Abkühlen auf Eis gestellt und in 50 ml Portionen in Greiner-Röhrchen bei 8000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 16 ml kaltem TFB1 Puffer (Tab. 3.22) resuspendiert und für 90 min auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C für 10 min und Entfernung des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 1,6 ml eiskaltem TFB2 Puffer (Tab. 3.22) resuspendiert. Die Suspension wurde in 100 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.7.2 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, 1-10 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz zugegeben, gemischt und die Transformationsansätze für 20 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Ansätze für 90 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und danach wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml Psi-Broth (Tab. 3.22) wurde die Suspension in ein Glasröhrchen überführt und 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert (phänotypische Expression). Je 200 µl der Ansätze wurden unverdünnt und in 1:10 Verdünnung (in 0,9 % NaCl) auf LB-Platten mit X-Gal und dem zur Selektion verwendeten Antibiotikum (Tab. 3.22) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Tab. 3.22: Lösungen zur Transformation von *E. coli*

Komponente	Menge / Konzentration
TFB 1 Puffer	
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern	
TFB 2 Puffer	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %
pH 8 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
Psi-Broth	
LB-Medium autoklavieren, danach zugeben:	
MgSO ₄ (autoklaviert)	4 mM
KCl (autoklaviert)	10 mM
X-Gal (Applichem); vor Zugabe zum Agar in 60 µg/ml Dimethylformamid (0,5 ml) lösen	
Ampicillin	100 µg/ml
Stammlösung (in H ₂ O)	10 mg/ml

3.8 Präparation genomischer DNA aus *S. pneumoniae*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *S. pneumoniae* wurde in dieser Arbeit eine Methode verwendet, die auf der Methode von Marmur (Marmur, 1961) basiert. Die Methode ist schnell, beinhaltet allerdings die Gefahr der Fragmentierung der chromosomalen DNA durch Scherkräfte.

Für die Präparation wurden 10 ml einer *S. pneumoniae* Kultur bei einer Zelldichte von ungefähr $N=60$ geerntet, indem sie in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 7500 rpm für 15 min zentrifugiert wurden (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Bakterienpellet in 2 ml 0,9 % NaCl resuspendiert. Je 1ml der Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Bakterienpellets bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden 180 μl TE-Puffer (Tab. 3.23) zugegeben und bis zur vollständigen Resuspension der Zellen gevortext. Im Folgenden wurden 20 μl RNase-Lösung (Tab. 3.23) zugegeben und das Reaktionsgefäß in ein 37°C Wasserbad gestellt. Zur Lyse wurden 200 μl 2 % SDS zugegeben und durch invertieren gemischt. Nach vollständiger Lyse wurde zunächst für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Proteinase K-Lösung (Tab. 3.23) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min bei 37°C wurden 500 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt und für 30 min auf einem Eppendorfschüttler gerüttelt. Der Ansatz wurde für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert, die wässrige Oberphase abgehoben und die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion wiederholt (20 min schütteln), bis die Interphase klar war. Nachdem die Oberphase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde zum Fällen der DNA das einfache Volumen (500 μl) Isopropanol (100 %) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit Ethanol (100 %, p.a.) gewaschen. Die DNA wurde im Exsikkator oder für 5-10 min bei 55°C getrocknet und in 100 μl TE-Puffer gelöst, indem die Ansätze kurz gevortext und über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei 37°C inkubiert wurden.

Tab. 3.23: Lösungen zur Präparation genomischer DNA aus *S. pneumoniae*

Komponente	Menge / Konzentration
TE-Puffer (1x)	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit HCl einstellen	
RNase Lösung	
Tris	10 mM
NaCl	15 mM
pH 7,5 einstellen, autoklavieren	
RNase A (Roth, Karlsruhe)	10 mg/ml
15 min bei 100°C kochen, bei -20°C lagern	
Proteinase K (Roth, Karlsruhe)	20 mg/ml in H ₂ O
Bei RT lösen, bei -20°C lagern	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	
Phenol	50 ml
Chloroform	48 ml
Isoamylalkohol	2 ml
20 ml 1xTE zum Equilibrieren zugeben, dunkel bei 4°C lagern	

3.9 Präparation von RNA aus *S. pneumoniae*

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen und es wurden RNase freie Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Lösungen wurden entweder mindestens zweimal autoklaviert oder mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

Zur Isolierung von RNA aus *S. pneumoniae* wurden 100 ml einer *S. pneumoniae* Kultur bei einer Zelldichte von $N=70$ geerntet, indem sie in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 8000 rpm für 4 min zentrifugiert wurden (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Bakterienpellet unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen Pellets wurden in 4 ml auf 60°C vorgewärmtem NAE-gesättigten Phenol-Chloroform (6:1; Tab. 3.24) resuspendiert. Nach Inkubation bei 60°C für 5 min wurden 4 ml auf 60°C vorgewärmter NAES-Puffer (Tab. 3.24) zugegeben und nochmals bei 60°C für 5 min inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis für 5 min wurden die Ansätze bei 8000 rpm für 8 min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Die wässrige Oberphase wurde in ein MaXtract High Density Tube (Qiagen) überführt, mit 4 ml Phenol-Chloroform (6:1) (RT) extrahiert und bei 8000 rpm für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Diese Phenolextraktion wurde ein zweites mal wiederholt. Danach wurde die Oberphase abgenommen, mit 400 µl

3. Material und Methoden

Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 4 ml Isopropanol gemischt und die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die Ansätze wurden im Folgenden bei 8000 rpm für 40 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml 70 % Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 450 μl DEPC- H_2O (Ambion) resuspendiert.

Für den folgenden DNase Verdau wurden 50 μl 10x DNase Puffer und 5 μl DNase (New England Biolabs) zugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, indem 500 μl Phenol / Chloroform (1:1) zugegeben wurden, 30 s gevortext wurde und 5 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert wurde. Die Oberphase wurde abgenommen, mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 2,5 Vol. kaltem Ethanol (100%) gemischt, mindestens 10 min bei -20°C inkubiert und bei 20000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge RS23, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 300 μl Ethanol 70% gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 100 μl DEPC- H_2O (Ambion) resuspendiert und nachdem die RNA vollständig resuspendiert war zur Kontrolle auf ein frisch gegossenes Agarosegel aufgetragen. Sollte die RNA in hoher Reinheit vorliegen, wurde auf die Phenol-Chloroform-Extraktion und die Ethanolfällung verzichtet und die RNA wurde stattdessen mit einem RNeasy Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der RNA wurde mittels eines NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt. Die DNA Freiheit der RNA Präparation wurde mittels PCR überprüft.

Tab. 3.24: Lösungen zur Präparation von RNA aus *S. pneumoniae*

Komponente	Menge / Konzentration
NAE-Puffer	
Na-Acetat pH 5,1	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
NAES-Puffer	
Na-Acetat pH 5,1	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
SDS	1 %
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	
Phenol (Roti Aqua Phenol, Roth)	30 ml
Chloroform	5 ml
für NAE-gesättigtes P/C/I 20 ml NAE-Puffer zum Equilibrieren zugeben; dunkel bei 4°C lagern	
Ethanol	70 %, p.a., in DEPC- H_2O (Ambion)

3.10 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

In dieser Arbeit wurde Plasmid DNA aus *E. coli* entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert oder nach einer Methode, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) basiert. Größere Mengen Plasmid DNA wurden isoliert, indem die Plasmide aus einer 50 ml *E. coli* Kultur mit dem NucleoBond PC 100 Kit (Macherey-Nagel) mit dem Protokoll für High Copy Plasmide nach Herstellerangaben isoliert wurden.

Bei der Methode nach Birnboim und Doly wurden 1,5 ml 2xTY Medium mit einem zur Selektion benötigten Antibiotikum mit einer Kolonie von *E. coli* beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die ÜN-Kultur wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfschüttler zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 100 µl Lösung I mit Lysozym (Tab. 3.25) vollständig resuspendiert und der Ansatz für 10 min auf Eis gehalten. Im folgenden wurden 200 µl Lösung II (Tab. 3.25) zugegeben, durch invertieren gemischt, der Ansatz für weitere 5 min auf Eis gehalten und 200 µl kalte Lösung III (Tab. 3.25) zugegeben. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde 15 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfschüttler zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol durch vortexen gemischt, für 5 min auf Eis gehalten und für weitere 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 200 µl Lösung IV mit RNase (Tab. 3.25) gelöst und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Tab. 3.23), wobei 10 min auf einem Eppendorfschüttler gerüttelt und 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Die wässrige Oberphase wurde in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Ethanol gemischt, für 5 min auf Eis gestellt und für 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Nach entfernen des Überstands wurde mit 200 µl Ethanol gewaschen, das Ethanol vollständig entfernt und das Pellet bei 55°C für 5-10 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde schließlich in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Tab. 3.25: Lösungen zur Plasmidpräparation aus *E. coli*

Komponente	Menge / Konzentration
2xTY Medium	
Trypton	16 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren	
LösungI	
Saccharose	30 %
Tris	25 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0 mit HCl einstellen, bei 4°C lagern	
LösungI mit Lysozym	
Lysozym	20 mg/ml
LösungII	
NaOH	0,1 N
SDS	1 %
LösungIII	
K-Acetat	1,5 M
pH 4,8 mit Essigsäure einstellen	
LösungIV	
Tris	50 mM
Na-Acetat	100 mM
pH 7,5 mit Essigsäure einstellen	
LösungIV mit RNase	
RNase (Tab. 3.23)	50 µg/ml

3.11 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarosekonzentration wurde abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente gewählt, im allgemeinen wurde eine Konzentration von 1 % für größere und 1,5 % bzw. 2 % für kleine Fragmente verwendet. Die Agarose (SeaKem LE, Biozym) wurde durch aufkochen in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer bzw. 1x TBE-Puffer (Tab. 3.26) gelöst und in horizontale Gelkammern gegossen, in die ein Kamm eingesetzt wurde. Nach vollständiger Polymerisation des Agarosegels wurde es in eine Laufkammer gesetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde jeweils derselbe Puffer wie zum Gießen des Gels benutzt, wobei TBE-Puffer hauptsächlich bei der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente Anwendung fand. Sollte RNA auf ein Agarosegel aufgetragen werden, so wurde das Gel direkt vor Verwendung gegossen und es wurde nur frisch angesetzter Puffer verwendet.

DNA-Proben wurden mit 2 µl 6x Probenpuffer (Tab. 3.26) und H₂O gemischt, so dass immer ein Ansatz von 12 µl in die Taschen des Gels pipettiert wurde. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 2x RNA Loading Dye (Fermentas) versetzt. Die Laufzeit des Gels war abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente und von der angelegten Spannung, wobei diese im Allgemeinen zwischen 100-130 V lag. Als Größenstandard wurde im allgemeinen GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Agarosegele zum Färben für 15-30 min in ein Ethidiumbromidbad (Konzentration ca. 0,5 µg/ml) gelegt. Anschließend konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

Die DNA-Konzentration wurde entweder anhand von Banden mit bekannter DNA-Menge auf dem Gel abgeschätzt oder mit einem NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt.

Sollten DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert werden, so wurde zum Färben stets ein frisch angesetztes Ethidiumbromidbad (Konzentration 0,5 µg/ml) benutzt und die DNA wurde so kurz wie möglich mit langwelligem UV-Licht belichtet. Die benötigten Banden wurden möglichst scharf ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Nucleospin Extract II Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

Tab. 3.26: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Komponente	Menge / Konzentration
TAE-Puffer (50x)	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100 ml
H ₂ O	ad 1 l
zum Gebrauch 1:50 verdünnen	
TBE-Puffer (10x)	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 ml
H ₂ O	ad 1 l
zum Gebrauch 1:10 verdünnen	
6x DNA Probenpuffer	
Bromphenolblau	0,25 %
Xylen Cyanol FF	0,25 %
Ficoll (Type 400, Pharmacia)	15 %
in H ₂ O	

3.12 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firmen Roche (Mannheim) New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Restriktionsansätze für analytische Verdaus hatten im Allgemeinen eine Größe von 10 µl, präparative Ansätze hatten eine Größe von bis zu 100 µl. Vor einer Weiterverwendung der geschnittenen DNA-Fragmente wurde mit Agarose-Gelelektrophorese die Vollständigkeit des Verdaus kontrolliert. Sollte die DNA im Folgenden in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, so wurden die Ansätze mit dem Jetquick PCR Purification Kit (Genomed) aufgereinigt oder mit Hilfe des Nucleospin Extract II Kits (Macherey-Nagel) über ein Agarosegel aufgereinigt (s. 3.11).

3.13 Reaktion mit T4-DNA-Polymerase und Klenow-Fragment

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen oder zum Abbau von 3'-Überhängen an DNA-Fragmenten, beispielsweise an PCR-Produkten die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden, wurden die T4-DNA-Polymerase oder das Klenow-Fragment verwendet. Die Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller (Roche; New England Biolabs) eingesetzt, wobei zum Auffüllen der zurückgesetzten 3'-Enden dNTPs (10 mM; Roth, Karlsruhe) zugegeben wurden. Die Ansätze wurden für 5-10 min bei 37°C inkubiert, für 10 min bei 75°C inaktiviert und mit dem Jetquick PCR Purification Kit (Genomed) oder dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

3.14 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten

Da Oligonukleotide und PCR-Produkte aufgrund der dort angelagerten Primer an ihren 5'-Enden nicht phosphoryliert sind, müssen sie vor einer Ligation phosphoryliert werden. Dazu wurden Oligonukleotide bzw. PCR-Produkte mit glatten Enden (z.B. nach Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase, s. 3.13) mit der T4 Polynucleotid Kinase (Roche) nach Herstellerangaben unter Zugabe von ATP (Endkonzentration 2,5 mM) behandelt. Nach Inkubation der Ansätze bei 37°C für 30 min erfolgte eine Aufreinigung mit dem Jetquick PCR Purification Kit (Genomed).

3.15 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Molekülen wurde die T4 DNA Ligase verwendet (Roche; New England Biolabs; Invitrogen). Diese stellt kovalente Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden von DNA-Molekülen her.

Für die Ligation von Vektoren und Inserts, die über glatte Enden verfügten oder über gleiche kohäsive Enden, wurde das Insert in einem mindestens 5fachen Überschuss eingesetzt. Besaßen die zu ligierenden DNA-Fragmente unterschiedliche Enden (z.B. *SphI* und *BamHI*), so wurde in den Ligationsansätzen im allgemeinen gleiche Mengen eingesetzt. Beispielsweise wurden zur Herstellung von pPP2 Reporterkonstrukten (s. 3.21) je ca. 0,09 pmol Vektor und Insert verwendet. In diesen Ansätzen wurde üblicherweise 1 µl der T4 DNA Ligase (z.B. Roche, 1 U/µl) eingesetzt, als Puffer wurde der 5x Ligasepuffer von Invitrogen verwendet, da dieser PEG (Polyethylenglycol) enthält, welches die intermolekulare Ligation fördert. Die Ligationsansätze wurden für mindestens 3 h oder über Nacht bei den von den Herstellern empfohlenen Temperaturen inkubiert.

3.16 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die PCR wird zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt. Zwei Oligonukleotide (Primer) gegensätzlicher Orientierung begrenzen dabei ein zu amplifizierendes Fragment auf einer Template-DNA. Im ersten Schritt der PCR werden durch hohe Temperatur doppelsträngige DNA-Moleküle aufgeschmolzen (Denaturierung). Im zweiten Schritt können sich bei wieder herabgesetzter, vom GC-Gehalt und der Länge der Primer abhängigen Temperatur die Primer an die komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA anlagern (Annealing). Im folgenden dritten Schritt wird bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur, ausgehend von den 3'-Enden der Primer, ein zur Template-DNA komplementärer neuer DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Durch mehrfache, im Allgemeinen 30-35fache Wiederholung dieser Schritte kann man ausgehend von einer sehr geringen Anzahl an ursprünglichen Molekülen des Templates eine sehr hohe Kopiezahl des erwünschten DNA-Fragments erhalten.

Die Red GoldStarTM DNA-Polymerase (Eurogentec, Belgien) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* wurde in dieser Arbeit eingesetzt, wenn die PCR-Produkte im

Weiteren nicht für Klonierungen benötigt wurden. Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes mit dieser Polymerase ist in Tab. 3.27 aufgeführt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde die iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) verwendet, da diese im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine proof reading-Aktivität (3'→5'-Exonuklease-Aktivität) besitzt. Tab. 3.28 zeigt die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes mit dieser Polymerase. Für beide Polymerasen wurden die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Tab. 3.27: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes (Taq-Polymerase)

Komponente	Menge
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Template-DNA	0,5-5 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth, Karlsruhe)	1 µl
Taq-Polymerase (Red GoldStar TM ; Eurogentec, Belgien)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tab. 3.28: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes (iProof-Polymerase)

Komponente	Menge
5x Puffer	20 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	5 µl
Template-DNA	1-5 µl
dNTP-Mix (10 mM; Roth, Karlsruhe)	2 µl
iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)	1 µl
H ₂ O	ad 100 µl

Sollte die PCR der Überprüfung von Transformanten dienen, so wurde auf die Isolation von chromosomaler bzw. Plasmid DNA verzichtet. Stattdessen wurde Zelllysat bzw. ein Teil einer Kolonie als Template verwendet. Dazu wurden 100µl einer Flüssig- oder Glycerinkultur für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl H₂O resuspendiert und 2 µl davon als Template in einer PCR mit der Taq-Polymerase eingesetzt. Zur Überprüfung von *E. coli* Transformanten wurde alternativ ein Teil einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher direkt in einen 50 µl PCR-Ansatz gegeben. Bei dieser Art des Templates wurde die Zeit der ersten Denaturierung der PCR auf 5 min erhöht.

Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes gewählt, wobei für die Amplifikation eines 1 kb großen DNA-Fragmentes bei Verwendung der Taq-Polymerase eine Elongationszeit von 1 min gewählt wurde, bei Verwendung der iProof-Polymerase etwa 25 s. Tab. 3.29 zeigt ein typisches PCR-Programm

mit der Taq-Polymerase, Tab. 3.30 mit der iProof-Polymerase. Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Dabei wurden die von den Herstellern der Primer angegebenen Schmelztemperaturen benutzt. Zum Amplifizieren der DNA-Fragmente wurden die Thermocycler Biometra UNO-Thermoblock und Biometra TGradient verwendet.

PCR-Produkte die im Folgenden in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden sollten, wurden mit dem Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) oder dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

Tab. 3.29: PCR-Programm (Taq-Polymerase)

Schritt	Temperatur	Dauer
1 vollständiges Aufschmelzen	96°C	2 min
2 Denaturierung	96°C	30 s
3 Annealing	x°C ¹	30 s
4 Elongation	72°C	1 min/kb
5 vollständige Synthese	72°C	4 min
6 Pause	10°C	

¹: im allgemeinen lag die Annealingtemperatur 5°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Die Schritte zwei bis vier wurden 30x wiederholt.

Tab. 3.30: PCR-Programm (iProof-Polymerase)

Schritt	Temperatur	Dauer
1 vollständiges Aufschmelzen	98°C	2 min
2 Denaturierung	98°C	10 s
3 Annealing	x°C ¹	15 s
4 Elongation	72°C	25 s/kb
5 vollständige Synthese	72°C	5 min
6 Pause	10°C	

¹: im allgemeinen entsprach die Annealingtemperatur der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Die Schritte zwei bis vier wurden 30x wiederholt.

3.17 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR ermöglicht die relative Quantifizierung einer spezifischen RNA in verschiedenen Proben. Eine der Proben dient dabei als Referenz für die anderen. So kann beispielsweise ermittelt werden, ob die Expression eines Gens in Stämmen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund unterschiedlich ist. Dazu wird zunächst die Gesamt-RNA der Stämme isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese dient dann als Template in der Realtime RT-PCR. Mittels Primern, die spezifisch für das zu analysierende Gen und ein bekanntermaßen nicht reguliertes Kontrollgen sind, wird eine PCR in Anwesenheit des DNA-bindenden Farbstoffs SYBR Green durchgeführt. Der Thermocycler, in dem eine Realtime PCR durchgeführt wird, misst am Ende eines jeden PCR-Zyklus die

Fluoreszenz, die von SYBR Green ausgeht, wenn der Farbstoff an DNA gebunden ist. Der Zeitpunkt bzw. PCR-Zyklus in dem so viel DNA im PCR-Ansatz ist, dass diese Fluoreszenz erstmals eine bestimmte Detektionsgrenze überschreitet, wird „crossing point“ oder Cp-Wert genannt. Der Cp-Wert sollte für das nicht regulierte Kontrollgen in allen Proben gleich sein. Ist er das nicht, so werden die Cp-Werte der anderen Ansätze einer Probe entsprechend des Unterschiedes des Cp-Wertes des Kontrollgens der Probe zum Kontrollgen in der Referenzprobe angepasst. Ist nach dieser Normalisierung der Cp-Wert des zu analysierenden Gens in dem Ansatz einer Probe geringer als in der Referenz, so heißt dies, dass schon zu Beginn der PCR mehr Template (cDNA) vorhanden war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des Gens in der Probe mit dem geringeren Cp-Wert höher war als in der Referenz. Um einen anschaulicheren Wert als den Cp-Wert angeben zu können, wird der Faktor, auch „Ratio“ genannt, berechnet, um den die Menge einer RNA in einer Probe im Vergleich zur Referenz abweicht. Als Grundlage für die Berechnung der Ratio dienen die Unterschiede der Cp-Werte. Da die Cp-Werte eine Anzahl von Zyklen angeben, bedeutet beispielsweise ein Unterschied der Cp-Werte von 3, dass 3 PCR-Zyklen mehr bzw. weniger benötigt werden, um in einer Probe die selbe Menge DNA zu amplifizieren wie in der Referenz. Da in jedem PCR-Zyklus die Menge der DNA verdoppelt wird, wird der Unterschied der Cp-Werte zur Basis von 2 logarithmiert. Somit würde ein Unterschied von 3 bedeuten, dass anfänglich ein 8facher Unterschied der vorhandenen cDNA Menge und somit ein 8facher Unterschied der Expression eines Gens vorlag.

Die Primerpaare für die Realtime RT-PCR (Tab. 3.14) wurden so gewählt, dass Produkte mit einer Länge von 141-150 bp nahe dem 5'-Ende eines Gens amplifiziert werden konnten. Als nicht reguliertes Kontrollgen wurde das Gyrase Gen *gyrA* gewählt. Die für die Realtime RT-PCR benötigte RNA wurde wie unter 3.9 beschrieben isoliert und mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Qualität der RNA wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die Konzentration wurde mit einem NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt und auf eine Konzentration von 200 ng/μl eingestellt. Die Abwesenheit von DNA-Verunreinigungen wurde überprüft, indem 0,5 μl der RNA als Template in einer PCR mit der Taq Polymerase (s. 3.16) mit denselben in der Realtime RT-PCR eingesetzten Primern eingesetzt wurde. Ein Produkt durfte bei ausreichender Reinheit der RNA nicht entstehen.

1 μg der RNA wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche) mit random Hexamer Primern nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. 5 μl der in DEPC-H₂O 1:100 verdünnten cDNA wurden in einer Realtime RT-PCR Reaktion mit dem SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) Kit (Takara) eingesetzt. Die Ansätze mit

einem Volumen von 20 µl enthielten genspezifische Primer in einer 0,2 µM Konzentration. Die Reaktionsansätze wurden in 20 µl LightCycler Kapillaren (Roche) für 15 s bei 3000 rpm in einer LC Carousel 2.0 Zentrifuge (Roche) zentrifugiert. Die Realtime RT-PCR wurde in einem LightCycler 2.0 Thermocycler (Roche) durchgeführt. Der initialen Denaturierung von 20 s bei 95°C folgten 40 Zyklen, jeweils bestehend aus 5 s Denaturierung bei 95°C und einem Annealing- und Elongationsschritt von 20 s bei 60°C. Die Temperaturänderung betrug dabei 20°C/s. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. An die PCR anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob die amplifizierten Produkte spezifisch waren. Dabei wurde die Temperatur kontinuierlich mit einer Temperaturänderung von 0,1°C/s von 65°C auf 95°C erhöht, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Die Auswertung der Experimente erfolgte mit der LightCycler Software 4.0 (Roche). Alle Experimente wurden mindestens je einmal mit denselben RNAs und mit RNAs aus völlig unabhängigen Kulturen wiederholt.

3.18 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurde der BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Zusammensetzung eines Standardansatzes der Sequenzreaktion ist in Tab. 3.31 gezeigt. Es wurden 10 ng Template-DNA / 100 bp eingesetzt. Tab. 3.32 zeigt den Ablauf der Sequenzreaktion in den Thermocyclern Biometra UNO-Thermoblock bzw. Biometra TGradient. Die Schritte zwei bis vier wurden 25x wiederholt.

Tab. 3.31: Reaktionsansatz der Sequenzreaktion

Komponente	Menge
Template-DNA (PCR-Produkt)	x µl ¹
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Dye-Terminator Mix	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

¹: abhängig von der Konzentration der Template-DNA

Tab. 3.32: Programm der Sequenzreaktion

Schritt	Temperatur	Dauer
1 vollständiges Aufschmelzen	96°C	1 min
2 Denaturierung	96°C	30 s
3 Annealing	50°C	15 s
4 Elongation	60°C	4 min
5 Pause	4°C	

Die Schritte zwei bis vier wurden 25x wiederholt.

Die Aufreinigung der Sequenzreaktion sowie die Auftrennung der Proben mit einem ABI 3100 16-Kapillar-Sequenzierer (Applied Biosystems) und die Ermittlung der Sequenzen erfolgte im Nano + Bio Center, TU Kaiserslautern. Zur weiteren Arbeit mit Nukleotidsequenzen wurden folgende Programme verwendet:

- Chromas 1.45; 1996-1998 Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia
- Clone Manager 7.0, Scientific and Educational Software
- Datenbanken: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/>

3.19 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

RACE ist eine Methode, mit der die 5'- und die 3'-Enden von RNAs bestimmt werden können (Argaman *et al.*, 2001; Bensing *et al.*, 1996; Schaefer, 1995). Die Methode kann, wie in dieser Arbeit, dazu benutzt werden, um Transkriptionsstartpunkte zu bestimmen. Dazu wird zunächst RNA isoliert. Diese wird dann mit dem Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) behandelt, um am 5'-Ende der mRNAs ein Pyrophosphat abzuspalten. Nur auf diese Weise kann im nächsten Schritt durch die T4 RNA Ligase ein RNA-Oligonukleotid mit bekannter Sequenz an das 5'-Ende mit dann nur noch einer Phosphatgruppe ligiert werden. Die Ligation, wie auch alle folgenden Schritte der 5'-RACE, wird aber zur Kontrolle auch mit RNA durchgeführt, die nicht mit TAP behandelt wurde. In einer Reversen Transkription mit einem Primer, der innerhalb des Gens liegt, dessen Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden soll, wird die RNA dann in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird in einer PCR mit einem genspezifischen und einem zum RNA-Oligonukleotid komplementären Primer amplifiziert. Entsteht dabei in dem Ansatz, der mit TAP behandelt worden war, ein Produkt, das in dem nicht TAP behandelten Ansatz nicht vorhanden ist, so wird dieses zur genaueren Analyse sequenziert. In der Sequenz ist dann zu erkennen, an welcher Stelle die Ligation von RNA-Oligonukleotid und mRNA stattgefunden hat. Damit ist die erste auf die Sequenz des RNA-Oligonukleotids folgende Base der gesuchte Transkriptionsstartpunkt.

Für die 5'-RACE wurden 15µg RNA von *S. pneumoniae* zunächst für 5 min bei 55°C inkubiert und dann mit 25 Units Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP; Epicentre Technologies) in 1x TAP-Puffer bei 37°C für 60 min inkubiert. Im Reaktionsvolumen von 50

μl waren 40 Units SUPERaseIN RNase inhibitor (Ambion) vorhanden. Parallel wurden weitere 15 μg RNA unter gleichen Bedingungen inkubiert, außer dass auf die Zugabe von TAP verzichtet wurde. Den Ansätzen wurden im Folgenden 250 μl DEPC- H_2O zugegeben und es wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, indem 300 μl Phenol / Chloroform (1:1) zugegeben wurden, 30 s gevortext wurde und 5 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert wurde. Die Oberphase wurde abgenommen, mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 2,5 Vol. kaltem Ethanol (100 %) gemischt, mindestens 10 min bei -20°C inkubiert und bei 20000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge RS23, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 200 μl Ethanol 70 % gewaschen und im Exsikkator oder für 10 min bei 55°C getrocknet.

Die RNA-Pellets wurden schließlich in 55 μl DEPC- H_2O (Ambion) resuspendiert und mit 500 pmol RNA Adapter (5' RACE ; Tab. 3.13) gemischt. Die Ansätze mit einem Volumen von 60 μl wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Ligation des RNA-Adapters wurde bei 17°C über Nacht durchgeführt, mit 100 Units T4 RNA Ligase (New England Biolabs) in 1x T4 RNA Ligase Puffer mit 80 Units SUPERaseIN (Ambion) in einem Reaktionsvolumen von 100 μl . Die Reaktionen wurden wie zuvor phenolisiert und mit Ethanol gefällt. Die RNA-Pellets wurden in 50 μl DEPC- H_2O (Ambion) aufgenommen.

Je 8,2 μl davon wurden für die Reverse Transkription mit genspezifischen Primern (Tab. 3.13) mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche) in einem Reaktionsvolumen von 20 μl nach Herstellerangaben eingesetzt. 2-5 μl der Reaktionen wurden für eine PCR mit der Taq-Polymerase verwendet. Es wurden ein zum RNA Adapter komplementärer Primer und ein genspezifischer Primer eingesetzt. Letzterer wurde so gewählt, dass er näher am gesuchten 5'-Ende lag als der in der Reversen Transkription verwendete Primer. Im Vergleich zu den Standardbedingungen der PCR mit der Red GoldStarTM DNA-Polymerase (s. 3.16) wurden folgende Bedingungen geändert: Die Reaktionsvolumen wurden auf 100 μl erhöht, es wurden je 25 pmol Primer und 25 nmol dNTPs eingesetzt. Der Ablauf der PCR war folgender: $95^\circ\text{C}/10$ min; 40 Zyklen $95^\circ\text{C}/30$ s, $46-50^\circ\text{C}/40$ s, $72^\circ\text{C}/25-40$ s; $72^\circ\text{C}/10$ min. 10 μl der Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Banden, die genauer analysiert werden sollten, wurden mit dem Nucleospin ExtractII Kit (Macherey-Nagel) aus dem Gel eluiert und entweder direkt sequenziert oder zunächst, nach Abbau der überhängenden 3'-Enden und Phosphorylierung, in mit *SmaI* verdauten dephosphorylierten pUC19 Vektor (Fermentas) kloniert.

3.20 Konstruktion von *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A

Mit Hilfe der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) können in das Genom von *S. pneumoniae* Mutationen und Konstrukte eingeführt werden, die keinen selektionierbaren Phänotyp verleihen. Die Kassette beinhaltet ein Kanamycinresistenzgen und ein Allel des Gens *rpsL*, welches dominant zu Streptomycinsensitivität führt. Die Streptomycinsensitivität ist auch dann dominant, wenn gleichzeitig auch ein Allel des Gens vorhanden ist, das Streptomycinresistenz verleiht.

Zum Einbringen eines nicht selektionierbaren Konstrukts in *S. pneumoniae* R6 mit Hilfe der Janus-Kassette, in dieser Arbeit die Punktmutation A152C (entspricht D51A) in *ciaR*, wurde ein Stamm benötigt, welcher durch eine Punktmutation in *rpsL* streptomycinresistent ist. Dieser Stamm (*S. pneumoniae* R6 Str^R) wurde von C. Volz (Volz, 2008) hergestellt. Die Janus-Kassette wurde mit den Primern *janus_f* und *janus_r* mit PCR mit der iProof Polymerase (Bio-Rad) amplifiziert, ebenso wie die zur Integration der Janus-Kassette in die Region von *ciaR* benötigten Fragmente (Primer *ciaRup_f* und *ciaRup_r_kan* bzw. *ciaRdown_f-rps* und *ciaRdown_r*). Die drei PCR-Produkte wurden mit überlappender PCR mit den Primern *ciaRup_f* und *ciaRdown_r* verbunden. Ein zuvor isolierter Stamm von *S. pneumoniae* R6 mit Streptomycinresistenz vermittelnder Punktmutation in *rpsL* wurde mit dem Produkt der überlappenden PCR transformiert. Die Selektion erfolgte auf D-Blutagar mit 200 µg/ml Kanamycin. Es wurden Transformanten isoliert, die durch Integration der Janus-Kassette in *ciaR* kanamycinresistent, aber streptomycinsensitiv waren (*S. pneumoniae* R6 *ciaR*-Janus).

Um ein Allel von *ciaR* mit einer A152C Mutation herzustellen, wurden zunächst zwei PCR-Produkte mit der iProof Polymerase (Bio-Rad) amplifiziert mit den Primern *cia_P1-2* und *cia_P2* bzw. *cia_P3* und *ciaH_rev*. Die Primer *cia_P2* und *cia_P3* besitzen im Vergleich zum Wildtypallel von *ciaR* eine Punktmutation (A152C). Die beiden PCR-Produkte wurden mit überlappender PCR mit den Primern *cia_P1-2* und R1728 verbunden. *S. pneumoniae* R6 *ciaR*-Janus wurde mit diesem Produkt transformiert. Die Selektion erfolgte auf D-Blutagar mit 200 µg/ml Streptomycin, da durch Integration des *ciaRA152C* Allels die Janus-Kassette im Genom von *S. pneumoniae* verloren gehen musste und mit ihr die von ihr ausgehende dominante Streptomycinsensitivität. Die Transformanten (*S. pneumoniae* R6 CiaRD51A) wurden durch Sequenzierung überprüft.

3.21 Konstruktion von pPP2 und Konstruktion der Reporterplasmide

Das Promotor Probe Plasmid pPP2 wurde ausgehend von pTP1htrA (Halfmann, 2004) konstruiert. Zunächst wurde eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle in pTP1htrA beseitigt. Dazu wurde das Plasmid mit *EcoRI* verdaut und die überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments (s. 3.13) aufgefüllt. Nach Ligation wurde das Plasmid mit *SphI* und *BamHI* verdaut, so dass das klonierte *htrA* Promotorfragment ausgeschnitten wurde. Der so verdaute Vektor wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und mit einer neuen multiple cloning site (MCS) ligiert. Diese bestand aus den miteinander hybridisierten und phosphorylierten (s. 3.14) Oligonukleotiden MCSneu1 und MCSneu2, welche zu *SphI* und *BamHI* kompatible Überhänge besaßen. Das so entstandene neue Translation Probe Plasmid pTP2 liefert bei Transformation in *E. coli* DH5 α auf LB-Platten mit X-Gal weiße Kolonien im Gegensatz zum Ausgangsplasmid pTP1htrA.

Um aus pTP2 das Promotor Probe Plasmid pPP2 mit Translationsinitiationssignalen herzustellen, wurden die zwei Oligonukleotide PPPlacZneu1 und PPPlacZneu2 hybridisiert, phosphoryliert und in mit *BamHI* verdautes pTP2 ligiert. Da die hybridisierten Oligonukleotide PPPlacZneu1 und PPPlacZneu2 Überhänge von *BamHI* bzw. *BglII* Schnittstellen besaßen, blieb bei der Integration in pTP2 nur eine *BamHI* Schnittstelle erhalten. Die nach Transformation in *E. coli* DH5 α auf LB-Platten mit X-Gal vorhandenen blauen Kolonien beinhalteten nur das erwünschte Plasmid pPP2, bei dem die *BamHI* Restriktionsschnittstelle der MCS erhalten blieb.

Promotorfragmente, deren Aktivität mit pPP2 überprüft werden sollte, wurden mit PCR mit der iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) und Primerpaaren, die beispielsweise für den Promotor von spr0931 spr0931_for und spr0931_rev hießen (Tab. 3.11), amplifiziert. Die PCR-Produkte und pPP2 wurden mit *SphI* und *BamHI* verdaut und miteinander ligiert. Die Klonierung erfolgte in *E. coli* DH5 α , wobei mit 100 μ g/ml Ampicillin selektioniert wurde. Die Plasmide, beispielsweise mit kloniertem Promotor von spr0931 pPP2spr0931 benannt, wurden mittels PCR mit den Primern MCS_fwd_Kontr und 274-lac (Tab. 3.12) und anschließender Sequenzierung überprüft. Nach Transformation von *S. pneumoniae* R6 bzw. seinen Derivaten mit den Reporterplasmiden (Selektion mit 3 μ g/ml Tetracyclin) wurde die Integration in *bgaA* mit PCR mit den Primerpaaren EII_fwd_Kontr und tetM_rev_Kontr bzw. lacZ_fwd_Kontr und bgaA_rev_Kontr (Tab. 3.12) überprüft.

3.22 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

Im β -Galaktosidaseassay nach Miller (1972) wird das chromogene Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) durch das Enzym β -Galaktosidase zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP) umgesetzt. ONP bewirkt dabei eine Gelbfärbung des Reaktionsansatzes, welche photometrisch bei 420 nm gemessen werden kann. Dabei ist die OD₄₂₀ ein Maß für die Konzentration der β -Galaktosidase im Reaktionsansatz. Der in dieser Arbeit durchgeführte β -Galaktosidaseassay basiert zwar auf dem Miller-Assay (Miller, 1972), wurde aber in einigen Punkten verändert. Beim Miller-Assay handelt es sich um einen Endpunktassay, welcher nicht den linearen Verlauf der Messung erkennen lässt. In dieser Arbeit wurde hingegen der Verlauf der Farbentwicklung mit einem Photometer aufgezeichnet, so dass der lineare Verlauf der Reaktion erkennbar war. Des Weiteren diente in dieser Arbeit nicht die optische Dichte der Kultur als Bezugsgröße für die β -Galaktosidaseaktivität, sondern die Proteinmenge im Reaktionsansatz.

3.22.1 β -Galaktosidaseassay aus Flüssigkultur

Vorkulturen von *S. pneumoniae* wurden in 6 ml C-Medium mit 100 μ l Glycerinkultur angeimpft. Bei einer Zelldichte von N=40-90 wurden die Kulturen in vorgewärmtes C-Medium überimpft, so dass eine Zelldichte von etwa N=2-5 erreicht wurde. Alle parallel in einem Versuch wachsenden Kulturen sollten dabei dieselbe Zelldichte haben. Bei einer optischen Dichte von etwa N=80-90 wurden 2 ml Kultur entnommen und für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Bei anderen Zelldichten wurde das Volumen der abzentrifugierten Kultur entsprechend angepasst. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation vollständig entfernt, das Pellet in 500 μ l Lysepuffer (Tab. 3.33) resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Lyse wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Bei schlecht lysierenden Zellen, beispielsweise bei Wachstum in THB-Medium, wurde die Triton-X-100 Konzentration im Lysepuffer auf 0,1 % erhöht und die Inkubationszeit bei 37°C wurde verlängert.

Für den Assay wurden 200 μ l des Zellextraktes (bzw. geeignete Verdünnungen in Lysepuffer) in eine Küvette gegeben und in einem über ein angeschlossenes Wasserbad beheizten Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) für 2 min auf 30°C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 μ l ONPG-Lösung (Tab. 3.33) gestartet. Die Absorptionsmessung bei 420 nm im Photometer erfolgte als Kinetik mit einem Messintervall von 30 s. Als Nullwert wurde ein Ansatz aus 200 μ l Lysepuffer und 800 μ l ONPG-Lösung verwendet.

Nach Beendigung der Messung konnte aus dem linearen Bereich des Absorptions-Zeit-Graphen die Steigung abgelesen werden, welche bereits ein Maß für die β -Galaktosidase-Konzentration im Ansatz darstellte.

Im Folgenden wurde die Gesamt-Proteinkonzentration im Zelllysate nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Dabei wurde RotiQuant (Roth, Karlsruhe) nach dem Mikroansatz nach Angaben des Herstellers verwendet. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde als Units in nmol freigesetztes o-Nitrophenol pro mg Protein pro Minute berechnet, in Anlehnung an die Berechnung der Miller-Units (Miller, 1972):

$$\text{Units} = \frac{s \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot m} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

$$s = \text{Steigung des Absorptions-Zeit-Graphen} = \frac{\Delta \text{OD}_{420}}{\Delta t} \left[\frac{1}{\text{min}} \right]$$

V = Reaktionsvolumen = 1 ml

ε = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm

$$= 4,5 \cdot 10^3 \left[\frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

d = Lichtweg = Dicke der Küvette = 1 cm

m = Masse des Proteins im Reaktionsansatz [mg]

Tab. 3.33: Lösungen für den β -Galaktosidaseassay

Komponente	Konzentration / Menge
Z-Puffer	
Na ₂ HPO ₄	60 mmol
NaH ₂ PO ₄	46 mmol
MgSO ₄	1 mmol
β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)	2,7 ml
H ₂ O	ad 1 l
pH 7, bei 4°C lagern	
Lysepuffer	
Z-Puffer mit Triton-X-100	0,05 %
ONPG-Lösung	
ONPG (Sigma) in Z-Puffer lösen	1 mg/ml

3.22.2 β -Galaktosidaseassay mit Zellen von D-Blutagar

Um die β -Galaktosidaseaktivität von Zellen zu bestimmen, die auf der Oberfläche einer Agarplatte gewachsen sind, wurden 400 μ l Kultur von *S. pneumoniae* bei einer Zelldichte von N=80-90 auf D-Blutagar ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert. Zum Abschwemmen der Zellen von der Oberfläche des Blutagars wurden 4 ml NaCl 0,9 % auf den Agar gegeben und mit einem Drigalski Spatel verteilt, so dass die Zellen von der Oberfläche

abgelöst wurden. 1 ml der Zellsuspension wurden für 1min bei 14000 rpm in einer Eppendorfcentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer mit 0,1 % Triton-X-100 (s. 3.22.1) resuspendiert. Die Lyse sowie der β -Galaktosidaseassay erfolgten wie unter 3.22.1 beschrieben.

3.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird dazu benutzt, Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Das stark anionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine an, wodurch deren Eigenladung überdeckt wird. Somit werden die Proteine im Gel nur nach ihrer Größe aufgetrennt. Während der Elektrophorese werden die Proteine einer Probe zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert, um im Folgenden in einem höherprozentigen und längeren Trenngel aufgetrennt zu werden. Nach der Elektrophorese können die Proteine im Gel durch Färbung mit dem Farbstoff Coomassie sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden für die SDS-PAGE die Mini-Protean 3 Gelapparaturen von Bio-Rad mit einer Gelgröße von 83x73x1 bzw. 0,75 mm (BxLxD) verwendet. Darin wurde zunächst das Trenngel (Tab. 3.34) gegossen, welches sofort mit Wasser überschichtet wurde. Nach vollständiger Polymerisation (mindestens 1 h) wurde das Wasser mit einem Filterpapier entfernt und das Sammelgel (Tab. 3.34) wurde auf das Trenngel gegossen, wobei zur Herstellung von Taschen ein Kamm eingesteckt wurde. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt. Die Apparatur wurde mit 1x Lämmli Laufpuffer (Tab. 3.34) befüllt. Die Proteinproben wurden mit 1 Vol. 2x Lämmli Probenpuffer (Tab. 3.34) versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Die denaturierten Proteinproben wurden, ebenso wie ein Proteinmarker (peqGoldII, peqLab), auf das SDS-Gel aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis das Bromphenolblau am unteren Rand des Sammelgels war. Danach wurde eine Spannung von 200 V angelegt, bis das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für mindestens 10-20 min in Coomassie Färbelösung (Tab. 3.35) leicht geschüttelt. Die Coomassie Färbelösung wurde abgeschüttelt und das Gel für 30 min in Entfärber 1 (Tab. 3.35) leicht geschüttelt. In Entfärber 2 (Tab. 3.35)

wurde der Hintergrund des Gels leicht schüttelnd über Nacht entfärbt und bis zur Dokumentation durch fotografieren aufbewahrt.

Tab. 3.34: Reagenzien für die SDS-PAGE

Komponente	Konzentration / Menge
Trenngel (12,5 %)	
H ₂ O	1,60 ml
30 % AA (w/v) 0,8 % BAA (w/v) (Roth, Karlsruhe)	2,05 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml
10 % SDS (w/v)	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat (APS) (w/v)	25 µl
TEMED (Roth, Karlsruhe)	2,5 µl
Sammelgel (4 %)	
H ₂ O	1,525 ml
30 % AA (w/v) 0,8 % BAA (w/v) (Roth, Karlsruhe)	0,325 ml
0,5 M Tris pH 6,8	0,625 ml
10 % SDS (w/v)	25 µl
10 % Ammoniumpersulfat (APS) (w/v)	12,5 µl
TEMED (Roth, Karlsruhe)	2,5 µl
5x Lämmli Laufpuffer	
Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 8,3	
2x Lämmli Probenpuffer	
H ₂ O	1,875 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
Glycerin 50 % (v/v)	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)	0,750 ml

Tab. 3.35: Lösungen für die Coomassie Färbung

Komponente	Konzentration / Menge
Coomassie Färbelösung	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O	ad 1 l
Entfärber 1	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O	ad 1 l
Entfärber 2	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

3.24 Überexpression und Aufreinigung von His₆-Proteinen

Zur Überexpression des Response Regulators CiaR und seinem Derivat CiaRD51A aus *S. pneumoniae* R6 wurden die beiden Gene zunächst mittels PCR mit der iProof DNA-Polymerase (Bio-Rad) mit den Primern ciaR-*Bam*HI und ciaR-*Sal*I aus *S. pneumoniae* R6 bzw. *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit *Bam*HI und *Sal*I verdaut und in den Vektor pQE30 (Qiagen), der mit denselben Enzymen verdaut wurde, kloniert. Durch diese Klonierung wurden die *ciaR* Gene in pQE30 um 12 Codons am 5'-Ende verlängert, wobei 6 dieser Codons für Histidin codierten (His₆-tag). Nach Transformation in *E. coli* JM109 wurden die Plasmide pQE30-*ciaR* und pQE30-*ciaRA152C* (entspricht CiaRD51A) durch Sequenzierung überprüft. Durch den His₆-tag konnten die Proteine im folgenden mit Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Dafür wurden zunächst *E. coli* JM109 pQE30-*ciaR* bzw. *E. coli* JM109 pQE30-*ciaRA152C* über Nacht in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin damit so angeimpft, dass die OD₆₀₀ nicht höher als 0,3 war. Die Kultur wurde schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,1 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Kultur zur Induktion der Expression der His₆-tag Proteine IPTG (Applichem) in einer Endkonzentration von 0,3 mM (entspricht 72 mg für 1 l Kultur) zugegeben. Vor der Induktion wurden der Kultur 500 µl entnommen, für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl 2x Lämmli Probenpuffer (Tab. 3.34) resuspendiert, für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C weggefroren. Die Kultur wurde über Nacht bei 15°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die OD₆₀₀ gemessen und 500 µl der Kultur als Probe nach der Induktion genommen. Diese wurde wieder für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl 2x Lämmli Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C weggefroren.

Die Kultur wurde bei 3000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 35 ml Lysepuffer (Tab. 3.36) resuspendiert und vier mal für 1 min mit einem Branson sonifier B-12 mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde bei 22500 g für 40 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. 100 µl des Überstandes wurden in einer „Kurzbindung“ für 1 h bei 4°C rollend mit 1 ml Lysepuffer und 60 µl Ni²⁺-Agarose (Qiagen), welche zuvor drei mal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen wurde, inkubiert. Danach wurde die Ni²⁺-Agarose wieder drei mal mit je 1 ml Lysepuffer

gewaschen und schließlich in 50 µl 2x Lämmli Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C weggefroren.

Die Kurzbindung wurde, ebenso wie die Proben die vor und nach der Induktion mit IPTG genommen wurden und dem Überstand und Pellet nach der Zentrifugation der mit Ultraschall lysierten Zellen, auf ein SDS-Polyacrylamidgel (3.23) aufgetragen, um den Erfolg der Überexpression des Proteins zu überprüfen. Dabei wurden die Mengen der aufgetragenen Proben so angepasst, dass sie immer etwa derselben Menge Kultur entsprachen.

Zur Aufreinigung der His₆-tag Proteine wurde der Überstand (35 ml) aufgetaut und mit 2,5 ml Ni²⁺-Agarose, welche zuvor drei mal mit je 25 ml Lysepuffer gewaschen wurde, für 1 h bei 4°C rollend inkubiert. Die Agarose und der Überstand wurden auf eine Leersäule (Econo-Pac, BioRad) gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Probe zur Analyse auf einem SDS-Gel wurde mit 2x Lämmli Probenpuffer gemischt, für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C weggefroren. Die auf der Säule zurückgebliebene Ni²⁺-Agarose wurde zweimal mit je 40 ml Waschpuffer (Tab. 3.36) gewaschen. Die an die Ni²⁺-Agarose gebundenen His₆-tag Proteine wurden mit 8 mal 1 ml Elutionspuffer (Tab. 3.36) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden einzeln aufgefangen und aufgrund der hohen Imidazolkonzentration im Elutionspuffer bei 4°C gelagert, da Proteine ausfallen, wenn sie in Anwesenheit von Imidazol weggefroren werden. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde sofort mittels Bradfordassay (Bradford, 1976) bestimmt. Dafür wurde RotiQuant (Roth, Karlsruhe) nach dem Mikroansatz nach Angaben des Herstellers verwendet.

Der Puffer der Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurde mit PD-10 Säulen (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gegen 1x Bandshift Puffer (s. 3.25) ausgetauscht. Die aufgereinigten Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft und die Konzentration durch Messen der OD₂₈₀ bestimmt. Dabei wurde der von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren abhängige Absorptionsfaktor eingerechnet.

Tab. 3.36: Lösungen für die Überexpression und Aufreinigung von His₆-tag Proteinen

Komponente	Konzentration / Menge
Lysepuffer	
Tris	50 mM
NaCl	200 mM
β-Mercaptoethanol	2 mM
Imidazol	10 mM
pH 8,0	
Waschpuffer	
Tris	50 mM
NaCl	300 mM
β-Mercaptoethanol	2 mM
Imidazol	20 mM
pH 8,0	
Elutionspuffer	
Tris	50 mM
NaCl	300 mM
β-Mercaptoethanol	2 mM
Imidazol	250 mM
pH 8,0	

3.25 Bandshift Assays

Mit Bandshift Assays, auch EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) genannt, kann die Bindung eines Proteins an DNA nachgewiesen werden. Dazu wird zunächst ein Protein, von dem beispielsweise vermutet wird, dass es im Promotorbereich eines Gens regulatorisch auf die Expression wirkt, mit entsprechender DNA zusammengegeben. Bindet das Protein an die DNA, läuft der Protein-DNA-Komplex langsamer in einem Polyacrylamid- oder Agarosegel als die freie DNA ohne Protein. Das „Shiften“ bzw. Hochrutschen der Bande ist nach Färben des Gels zu erkennen.

In dieser Arbeit wurden für die Bandshift Assays dieselben Promotorfragmente eingesetzt, welche auch in pPP2 kloniert wurden (s. 3.21). Für die Bandshift Assays wurden sie mit PCR mit der Taq Polymerase amplifiziert (s. 3.16), mit dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und auf eine Konzentration von 2,5 ng/μl in 1x Bandshift Puffer (Tab. 3.37) verdünnt. Vorversuche zeigten, dass His₆-CiaR (s. 3.24) nur effizient an DNA binden kann, wenn es zuvor phosphoryliert wird. Für die Phosphorylierung wurden 30 μg His₆-CiaR in Anwesenheit von 12,5 mM Acetylphosphat (Tab. 3.37) in 1x Bandshift Puffer in einem Gesamtvolumen von 77 μl für 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Bindung des phosphorylierten His₆-CiaR wurden verschiedene Mengen des Proteins mit je 5 ng DNA in

einem Gesamtvolumen von 15 µl in 1x Bandshiftpuffer gemischt. Die Mengen des eingesetzten phosphorylierten Proteins wurden so gewählt, dass der Einsatz von 1 µl der Phosphorylierungsreaktion einer Proteinkonzentration im Bindungsansatz von 0,5 µM bzw. einer Proteinmenge von 0,39 µg entsprach. Die Ansätze wurden für 20 min bei 25°C inkubiert. Danach wurden je 3 µl 6x Bandshift Probenpuffer (Tab. 3.37) zugegeben und die Ansätze komplett auf ein 8 % TGE-Polyacrylamidgel (Tab. 3.37) aufgetragen. Für das Gießen des Gels und die Elektrophorese, welche für 1 h bei 15 V/cm bei Raumtemperatur in 1x TGE-Puffer (Tab. 3.37) ablief, wurden Mini-Protean 3 Gelapparaturen von Bio-Rad mit einer Gelgröße von 83x73x1 bzw. 0,75 mm (BxLxD) verwendet. Die Gele wurden mit SYBR GreenI (Molecular Probes) für 15-20 min unter leichtem schütteln angefärbt und mit einem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) bei einer Wellenlänge von 514 nm gescannt.

Tab. 3.37: Reagenzien für Bandshift Assays

Komponente	Konzentration / Menge
1x Bandshift Puffer	
HEPES	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
DTT	1 mM
KCl	30 mM
MgCl ₂	10 mM
pH 7,9	
DTT (Dithiothreitol)	
DTT	1 M
Na-Acetat 3 M pH 5,0	772,5 mg
H ₂ O	16,5 µl
sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20°C lagern	ad 5 ml
Acetylphosphat	
in Tris 10 mM, pH 7,4; in Aliquots bei -20°C lagern	0,5 M
6x Bandshift Probenpuffer	
TBE (s. Tab. 3.26)	0,15fach
Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
pH 7,9	
5x TGE Puffer	
Tris	250 mM
Glycin	2 M
EDTA	8,65 mM
pH 8,4	
8 % TGE-Polyacrylamidgel	
H ₂ O	5,25 ml
30 % AA (w/v) 0,8 % BAA (w/v) (Roth, Karlsruhe)	2,7 ml
5x TGE Puffer	2 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) (w/v)	50 µl
TEMED (Roth, Karlsruhe)	5 µl

4 Ergebnisse

Das Zwei-Komponenten System CiaRH ist in *S. pneumoniae* an der Regulation der Phänotypen Kompetenz, Lyse, Virulenz und Resistenz gegen Cefotaxim beteiligt (Mascher *et al.*, 2006a; Zähler *et al.*, 2002). Eine Vielzahl von Genen, deren Expression von CiaRH abhängt, wurden in verschiedenen Transkriptomstudien identifiziert (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006). Dabei blieb jedoch weitgehend unklar, welche Gene durch CiaRH direkt und welche indirekt reguliert werden.

Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit die Bindestelle von CiaR identifiziert und das zentrale Regulon des Zwei-Komponenten Systems definiert werden. Im Weiteren werden dann die Expression dieser Gene unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und die Vorgänge bei der Phosphorylierung von CiaR untersucht werden.

4.1 Konstruktion und Evaluierung des Promotor Probe Plasmids pPP2

Zur Untersuchung von Promotoraktivitäten haben sich Reportersysteme bewährt, welche beispielsweise über ein β -Galaktosidasegen verfügen, welches unter die Kontrolle eines beliebigen Promotors gestellt werden kann. Ein solches Reportersystem wurde für *S. pneumoniae* in Form des Pneumo-Promotor-Probes (pPP1, Abb. 4.1) entwickelt. Bei ersten Versuchen, die mit pPP1 durchgeführt wurden, stellte sich die maximal messbare β -Galaktosidaseaktivität allerdings als sehr schwach dar (Halfmann, 2004). Da in dieser Arbeit die *cia*-abhängige Regulation von Promotoren untersucht werden sollte, erschien es sinnvoll, zunächst pPP1 zu überarbeiten, um eine zuverlässig messbare β -Galaktosidaseaktivität erreichen zu können.

pPP1 beinhaltet als Reporter gen eine *spoVG'*-*lacZ* Fusion, die ursprünglich in *Bacillus subtilis* eingesetzt wurde (Youngman *et al.*, 1989; Abb. 4.1). Dieses Fusionsgen besitzt als Startcodon ein GTG, was weniger effizient ist als ATG. Zudem entsteht bei Klonierung von Promotoren in pPP1 eine lange nicht translatierte Region, welche zur Destabilisierung der mRNA und damit zu einer geringeren β -Galaktosidaseexpression beitragen könnte. Daher sollte in dem in dieser Arbeit konstruierten Reporterplasmid die *spoVG'*-Fusion ersetzt werden. Dazu wurde die Ribosomenbindestelle, das Startcodon und die ersten vier Codons des Gens *htrA* von *S.*

pneumoniae R6 anstelle von *spoVG* an *lacZ* kloniert. Die Translationsinitiationssignale von *htrA* wurden dafür ausgewählt, weil eine translationelle *lacZ* Fusion von *htrA* in pTP1 eine starke β -Galaktosidaseaktivität lieferte (Halfmann, 2004). In diesem Zusammenhang wurde auch die multiple cloning site (MCS) ausgetauscht.

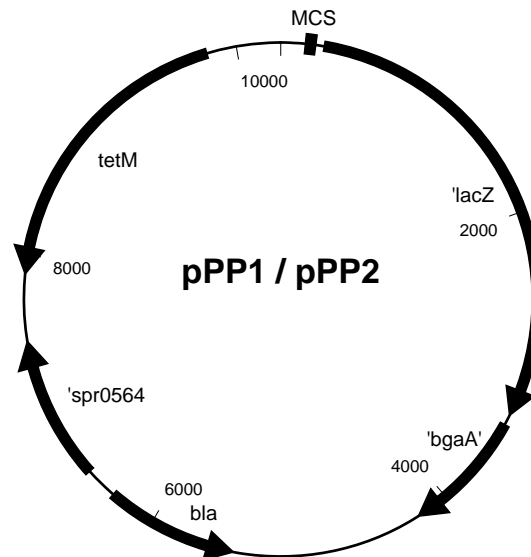


Abb. 4.1: Genetische Karte der integrativen Promotor Probe Plasmide pPP1 und pPP2. Beide Plasmide unterscheiden sich in der multiple cloning site (MCS) und dem 5'-Ende des *lacZ* Reportergens (s. Abb. 4.2). *tetM* verleiht Tetracyclinresistenz in *S. pneumoniae*, das β -Laktamasegen *bla* führt zu Ampicillinresistenz in *E. coli*. *bgaA* und *spr0564* werden zur Integration in das Genom von *S. pneumoniae* benötigt.

Da die neue MCS eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle enthalten sollte, musste zunächst eine solche Schnittstelle in pTP1 (GenBank Nr. DQ431185) beseitigt werden. Dazu wurde zunächst pTP1*htrA* (Halfmann, 2004) mit *EcoRI* verdaut und die entstandenen Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Aus dem entstandenen Plasmid wurde die klonierte *htrA* Promotorregion mit *SphI* und *BamHI* ausgeschnitten und durch die neue MCS ersetzt (Abb. 4.2). Das so entstandene Translation-Probe Plasmid pTP2 (GenBank Nr. EF061140) wurde mit *BamHI* verdaut, um die von *htrA* abgeleitete Translationsinitiationsregion als *BamHI*-*BglII* Fragment an *lacZ* fusionieren zu können. Auf diese Weise blieb die *BamHI* Restriktionsschnittstelle der MCS erhalten, wohingegen innerhalb von *lacZ* keine *BamHI* Restriktionsschnittstelle mehr vorhanden war. Wie in Abb. 4.2 zu sehen ist, wurden vor der Ribosomenbindestelle Stoppcodons in allen drei Leserahmen eingefügt, um ein translationelles Durchlesen vom klonierten Promotor her zu verhindern.

mindestens das 22fache (P_{htrA} in R6) zu den entsprechenden Werten in pPP1 lassen zudem die unterschiedlichen Aktivitäten dieser Promotoren in pPP2 deutlicher erkennen. Die schon mit pPP1 beobachtete *cia*-abhängige Regulation dieser Promotoren wird auch mit den pPP2 Konstrukten deutlich. Für $P_{1_{spr1149}}$ und P_{htrA} ist ein drastischer, für P_{ciaR} ein moderater Verlust der β -Galaktosidaseaktivität in dem Stamm mit inaktiviertem *cia*-System zu beobachten. Der Promotor des Gens *manL*, welches auch schon in Transkriptomstudien als negativ von CiaRH reguliert erkannt wurde (Mascher *et al.*, 2003), zeigt hingegen eine Zunahme der β -Galaktosidaseaktivität bei Abwesenheit des *cia*-Systems. Seine Nützlichkeit bewies pPP2 bereits in mehreren Regulationsstudien in *S. pneumoniae* (Halfmann *et al.*, 2007a; Kloosterman *et al.*, 2007; Volz, 2008).

Der Promotor P_{vegII} , der als Positivkontrolle dienen sollte, lieferte in pPP1 keine β -Galaktosidaseaktivität. Auch in pPP2 blieb seine Aktivität sehr schwach (Tab. 4.1). Daher wurden zwei veränderte Versionen dieses Promotors konstruiert (Abb. 4.3). In P_{vegW} wurde im Vergleich zu P_{vegII} der Abstand zwischen -35 und -10 Region auf den idealen Abstand von 17 bp verkürzt, in P_{vegM} wurden zudem in diesem Bereich zwei Mutationen eingeführt und der Transkriptionsstartpunkt wurde von G zu A verändert. Die in Tab. 4.1 für diese beiden Promotoren aufgeführten Aktivitäten lassen erkennen, dass beide aufgrund ihrer starken Aktivität als Positivkontrollen dienen können, da zudem die Aktivität unabhängig von der Inaktivierung von *ciaR* ist.

P_{vegII}						
TTGGACTCCT	GTTGATAGAT	CCAGTAATGA	CCTCAGAACT	CCATCTGGAT	TTGTTTCAGAA	
CGCTCGGTTG	CCGCCGGGCG	TTTTTTTATTG	GTGAGAATCC	AAGCTCGGAA	TTAATTCTCA	
TGTTTGACAG	CTTATCATCG	AATTATAGGA	ATAGAGCAAA	CAAGCAAAGG	AAATTTTGTC	
AAAATAATTT	TATTGACAAC	GTCTTATTAA	CGTTGATATA	ATTTGCAAGC	TGG	
P_{vegW}						
TTGGACTCCT	GTTGATAGAT	CCAGTAATGA	CCTCAGAACT	CCATCTGGAT	TTGTTTCAGAA	
CGCTCGGTTG	CCGCCGGGCG	TTTTTTTATTG	GTGAGAATCC	AAGCTCGGAA	TTAATTCTCA	
TGTTTGACAG	CTTATCATCG	AATTATAGGA	ATAGAGCAAA	CAAGCAAAGG	AAATTTTGTC	
AAAATAATTT	TATTGACAAC	GTCTTATTAA	CTTGATATAA	TTTGCAAGCT		
P_{vegM}						
TTGGACTCCT	GTTGATAGAT	CCAGTAATGA	CCTCAGAACT	CCATCTGGAT	TTGTTTCAGAA	
CGCTCGGTTG	CCGCCGGGCG	TTTTTTTATTG	GTGAGAATCC	AAGCTCGGAA	TTAATTCTCA	
TGTTTGACAG	CTTATCATCG	AATTATAGGA	ATAGAGCAAA	CAAGCAAAGG	AAATTTTGTC	
AAAATAATTT	TATTGACAAC	GTCTTATTAA	TATGATATAA	TTTGCAAGCT		

Abb. 4.3: Nukleotidsequenzen des Promotors P_{vegII} und seinen Derivaten P_{vegW} und P_{vegM} . Die -35 Region ist grau markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün. Die Promotorfragmente wurden als *SphI*-*Bam*HI Fragmente in pPP2 kloniert.

4.2 Identifikation potentieller Promotoren mit CiaR-Bindestelle im Genom von *S. pneumoniae* R6

In verschiedenen Transkriptomstudien konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die durch das CiaRH Zwei-Komponenten System reguliert werden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006). Jedoch blieb dabei unklar, welche dieser Gene direkt durch den Response Regulator CiaR reguliert werden und bei welchen Genen die Regulation indirekt erfolgt.

Erste Experimente, in denen die *cia*-abhängige Regulation der Promotoren von *ciaR*, *spr1149* (*lic*), *htrA* und *manL* untersucht wurden (s. 4.1 und Halfmann, 2004), ließen vermuten, dass diese vier Gene direkt von CiaR reguliert werden könnten. In den Promotorregionen dieser Gene befindet sich ein direkter Repeat, welcher eine Bindestelle für einen transkriptionellen Regulator wie CiaR darstellen könnte. In Abb. 4.4 ist eine aus der Sequenz der vier Promotoren abgeleitete potentielle CiaR-Bindestelle, welche aus einem Repeat mit der Sequenz TTTAAG-N₅-TTTAAG etwa 10bp stromaufwärts einer -10 Region besteht, dargestellt.

5' **TTTAAG** - N₅- **(T/A)TTAAG** -N₁₀-TATAAT^{3'}

Abb. 4.4: Potentielle CiaR-Bindestelle. Der Repeat, an den CiaR vermutlich bindet, ist rot markiert, die -10-Region blau.

Sollte dieser Repeat tatsächlich die CiaR-Bindestelle darstellen, so müssten weitere *cia*-regulierte Gene diesen ebenfalls in ihrem Promotorbereich besitzen. Daher wurde die in Abb. 4.4 gezeigte potentielle CiaR-Bindestelle für eine Suche mit dem Programm Search Pattern des StreptoPneumolist Servers (<http://genolist.pasteur.fr/StreptoPneumoList/index.html>) eingesetzt. Dabei mussten die Repeats einen Abstand von 5bp haben und je Hälfte des Repeats war eine Fehlpaarung erlaubt, in der -10 Region zwei. Die mögliche -10 Region durfte einen Abstand von 9-11 bp von dem Repeat haben. Des weiteren wurde auch das Programm Motif Search des Nano + Bio Centers der TU Kaiserslautern verwendet (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/>), wobei die selben Kriterien wie bei Search Pattern verwendet wurden.

Zusätzlich wurden die Bereiche stromaufwärts von Genen, die schon zuvor als *cia*-reguliert beschrieben worden sind (s. Tab. 2.1), auf das Vorhandensein von Promotoren mit potentieller CiaR-Bindestelle hin untersucht, ebenso wie Regionen, die in einer genomweiten Bindestudie eine Bindung an CiaR zeigten (Mascher *et al.*, 2003). Dabei wurde zusätzlich vor *dltA* (Kovács *et al.*, 2006) eine mögliche CiaR-Bindestelle entdeckt, welche in ihrer Lage jedoch nicht den

genannten Kriterien entspricht. Auch die potentiellen Bindestellen in den Promotorbereichen von *ciaR*, *spr0931* und *manL* konnten nur visuell erkannt werden. Insgesamt konnten so 20 potentielle Promotoren mit einer vermuteten CiaR-Bindestelle identifiziert werden (Tab. 4.2). Bei der Identifizierung der potentiellen Promotoren erschien es teilweise sinnvoll zu sein, auch Promotoren zu berücksichtigen, die innerhalb des translatierten Bereichs eines Gens lagen. In diesen Fällen wurden andere, als die von Hoskins *et al.* (2001) annotierten Startcodons stromabwärts der potentiellen Promotoren identifiziert.

Tab. 4.2: Potentielle *cia*-regulierte Promotoren in *S. pneumoniae* R6.

Stromabwärts gelegenes Gen	Potentielle <i>cia</i> -regulierte Promotoren
<i>ccnC</i>	AGATT TTTAAG ATTTG TTTAAG ATAGGTCGGG TATACT ATAGACGGTTACAAGAAGAC
<i>ccnE</i>	GAAAT TTTAAG TTCTAT TTTAAG ATTAGATGTG TATACT TATAATCATTAAATAAAGACC
<i>ccnA</i>	TTTT CTTAAG CAAAAT TTTAAG GATGGTCTAG TATTAT ATAGTCATTAAATAAAGACC
<i>ccnB</i>	GAAA AGTTAAG CTAGT TTTAAG TTTCGTCTTG TATCAT GTAGTTATTAAATAAAGACC
<i>ccnD</i>	AAAT CTTAAG GAAAC TTTAAG CTAGGGAGTG TACACT AAAGTTCATAAGTTAAGAAGA
<i>manL</i>	GTTGCTTTTTTTATGAAAACGGTT TATACT TAAAC AG CTTAAAGTTTTCTTAAATGA GAATTT GTCA GAATTT CAAAA GAATTT
<i>ciaR</i>	AGAGAG GTTGAG TTTTTT TTTAAG GCAAATTTGG TATAAT AGTTT T AATAAGGAGGAGTT
<i>spr0782</i>	CTTTTT TTTAAG ATTTTT TTTAAA GAAACAGAG TATAAT AAATCATAATCAAAGGAGAGA
<i>ppmA</i>	ATGAT TTTCAG AAAAAT TTTAAG AAAAAATAG TAAAA TAGATAGAGTAACACTTATCTC
<i>mscL</i>	CTCCAT TTTATG AGCCTTT TTAAT TGCCTTCTATA AATGAT TTAGGATACAATGAAACACG
<i>spr0931</i>	TTTGT TATAAG TTTTCT TTTAAG ATAGATATAT TACTCT AAAGAAGTAAAGGAGGAAAT
<i>spr0959</i>	AGACAT TTTAAG AAGCCT TTTAAG ACATTTAAGG AAAAAT GAGATACCGTTTCGTGAATTT
<i>spr1149 (lic)</i>	TAAGT TTTAAG TTTTCT TTTAAG GAAAGTATAT TATTCT GAAGG A CTCTAAAAATTTTCGC
<i>spr1403</i>	AATAATATAAGTGGCT TTTAAG TGCAAAAACAGAA TATATT AATTGTTTCAGAAAAATAT
<i>axe</i>	GAAA CTTAAG CTAGTTTT TTAG GTTTGGCTCT TATACT AAAAGTCATCAAAAAGAAAACG
<i>spr1787</i>	TTCCA TTTAAG CTAAT TTTAAC TTTTTT TGTTATAAT CAAGAAAGATGTTTCACAGAAA
<i>dltX</i>	TCCTAAAATAAGCTGAAATCTATTGGAAACATACGGTAAACAAT TGAAA AGATACTATATAAAG TGGTACAAT GAATTT TATTC SACTTT
<i>malM</i>	AAAAT TTTAAAA AAATTT TTTAAG CTTGATT TGATAG CATAAATTTTGCATTTTAAATAGAA
<i>arcA</i>	TCCTC TTTAAT AGAAG TTTATG CATTTGTATA TATATA TTCCATCCTATGTTATGTATA
<i>htrA</i>	TTGTG TTTAAG TTATA TTTAAG CTAGTCAGTT TATACT TTTCAG A AATTCAAACATATG

Die mögliche Bindestelle von CiaR ist rot markiert, die -10 Region der potentiellen Promotoren gelb, -35 Regionen grau, bereits bekannte Transkriptionsstartpunkte (Merai, 2003) grün. Der nicht gezeigte Transkriptionsstartpunkt von *dltX* ist ebenfalls bekannt (Kovács *et al.*, 2006).

4.3 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte potentiell *cia*-regulierter Gene

Von den 20 in Tab. 4.2 gezeigten potentiellen *cia*-regulierten Promotoren war größtenteils nicht bekannt, ob sie tatsächlich funktionell sind, d.h. ob in diesen Regionen eine Initiation der Transkription stattfindet. Daher mussten zunächst die Transkriptionsstartpunkte der stromabwärts gelegenen Gene ermittelt werden. Dies sollte mit der relativ neuen Methode 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) geschehen. Zunächst wurden die Transkriptionsstartpunkte von *ciaR*, *htrA* und *spr1149 (lic)* ermittelt. Von diesen Genen, sowie von *manL*, waren die Transkriptionsstartpunkte bereits zuvor mit Primer Extension ermittelt worden (Merai, 2003), so dass eine Kontrolle für die Ergebnisse der 5'-RACE vorhanden war.

Die Methode der 5'-RACE (für eine genauere Beschreibung s. 3.19) basiert auf der anfänglichen Behandlung der RNA mit dem Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP), welche ein Pyrophosphat am 5'-Ende der mRNAs abspaltet. Nur so sollte im weiteren die Ligation eines RNA-Oligos möglich sein. Parallel zur TAP behandelten Probe wird auch ein Ansatz parallel durchgeführt, in welchem auf die Zugabe des Enzyms TAP verzichtet wird. Wie in Abb. 4.5 zu erkennen ist, resultiert die 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *htrA* in einem PCR-Produkt mit einer Größe von 197 bp, welches ausschließlich in dem TAP-behandelten Ansatz vorhanden ist.

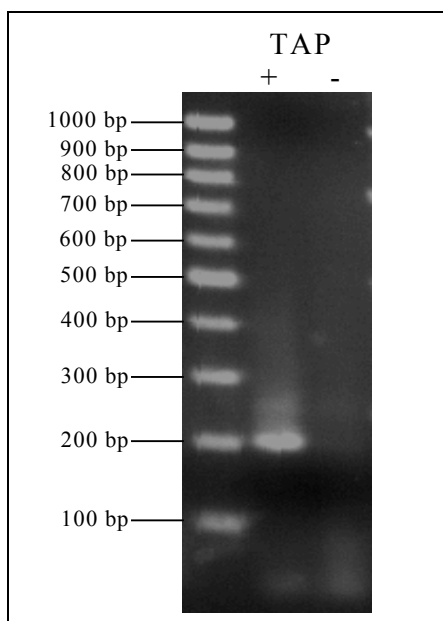


Abb. 4.5: 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *htrA*. 2% TBE-Agarosegel. Spur 1: Marker; Spur 2: PCR der TAP-behandelten RNA mit dem RNA-Oligo spezifischen Primer RACE_PCR_5' und dem *htrA* spezifischen Primer *htrA_RACE_3'*; Spur 3: PCR der nicht TAP-behandelten RNA mit dem RNA-Oligo spezifischen Primer RACE_PCR_5' und dem *htrA* spezifischen Primer *htrA_RACE_3'*.

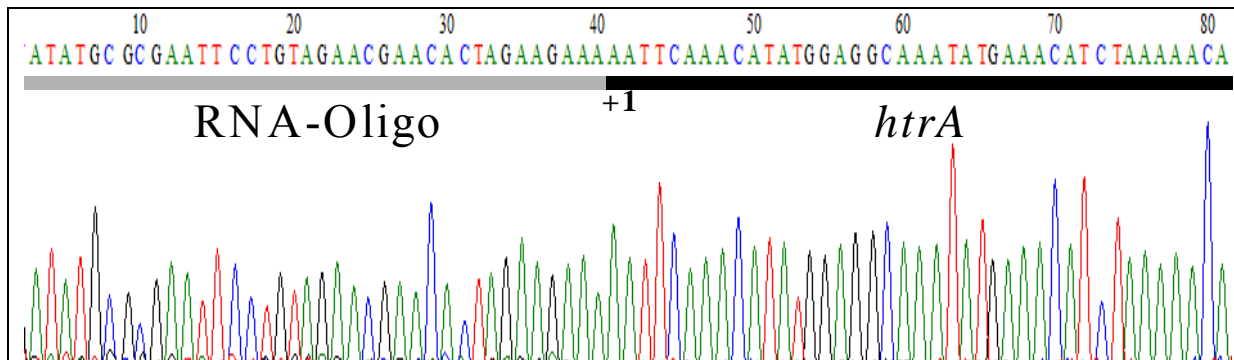


Abb. 4.6: Sequenz der 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *htrA*. Die Sequenz des RNA-Oligos ist mit einem grauen Balken markiert, die des *htrA* Transkripts mit einem schwarzen. Der Transkriptionsstartpunkt von *htrA* ist mit +1 markiert.

Dieses PCR-Produkt wurde mit den Primern RACE_PCR_5' und *htrA*_RACE_3' amplifiziert und besteht somit aus 158 bp, die vom Transkript von *htrA* stammen und 39 bp die vom ligierten RNA-Oligo stammen. Die Sequenz dieses PCR-Produktes um die Fusionsstelle des *htrA*-Transkripts mit dem RNA-Oligo ist in Abb. 4.6 gezeigt. Die erste, auf die Sequenz des RNA-Oligos folgende Base ist der Transkriptionsstartpunkt von *htrA*.

Jedoch war die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mit der 5'-RACE nicht immer so eindeutig wie bei *htrA*. Ein Beispiel dafür ist die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *spr1149*. Abb. 4.7 zeigt, dass zum einen zwei deutlich unterschiedliche Produkte in der PCR amplifiziert wurden, und dass diese zudem auch in dem nicht TAP-behandelten Ansatz deutlich erkennbar sind. Zunächst würde dieses Ergebnis vermuten lassen, dass es sich daher um unspezifische Abbauprodukte handelt, welche nicht zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *spr1149* dienen. Allerdings wurden beide Produkte sequenziert und es zeigte sich, dass mit dem größeren Produkt der bereits mittels Primer Extension ermittelte Transkriptionsstartpunkt bestätigt werden konnte (Merai, 2003). Das kleinere Produkt lieferte einen zweiten Startpunkt von *spr1149*, welcher exakt zu einem potentiellen Promotor mit perfekter -10 Region passte (P2 in Abb. 4.19). Um sicherzustellen, dass es sich bei den bestimmten 5'-Enden wirklich um Transkriptionsstartpunkte handelt, sollten jedoch transkriptionelle Reportergenfusionen hergestellt werden. Wie in Abschnitt 4.4 gezeigt wird, geht von beiden Promotoren *in vivo* tatsächlich eine deutliche Aktivität aus, so dass trotz der deutlichen PCR-Produkte in dem nicht TAP-behandelten Ansatz mit der 5'-RACE die korrekten Transkriptionsstartpunkte von *spr1149* ermittelt werden konnten. Relativ starke PCR-Produkte in den nicht TAP-behandelten Ansätzen der 5'-RACE sind häufiger zu beobachten, wie beispielsweise auch die Ergebnisse von Vogel *et al.* (2003) zeigen.

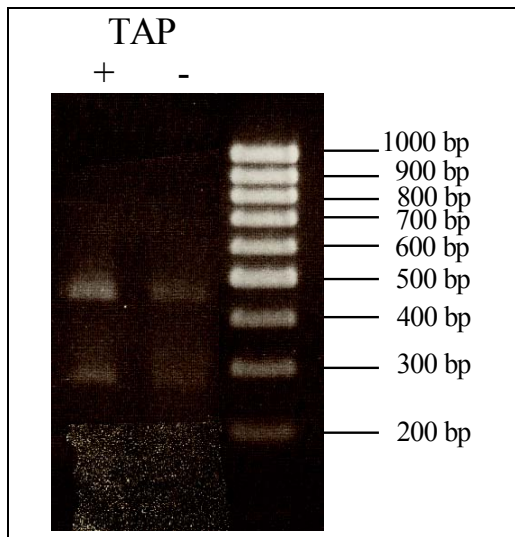


Abb. 4.7: 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von spr1149 (lic). 2% TBE-Agarosegel. Spur 1: Marker; Spur 2: PCR der TAP-behandelten RNA mit dem RNA-Oligo spezifischen Primer RACE_PCR_5' und dem spr1149 spezifischen Primer spr1149_RACE_3'; Spur 3: PCR der nicht TAP-behandelten RNA mit dem RNA-Oligo spezifischen Primer RACE_PCR_5' und dem spr1149 spezifischen Primer spr1149_RACE_3'.

Eine weitere Auffälligkeit bei der 5'-RACE von *ciaR*, *htrA* und *spr1149* war, dass die so ermittelten Transkriptionsstartpunkte jeweils 1 bp stromabwärts der Startpunkte liegen, die mit Primer Extension ermittelt wurden. Dieses Phänomen wurde auch von Silvaggi *et al.* (2005) bei der Bestimmung des 5'-Endes des Antitoxins RatA von *B. subtilis* beobachtet. Eventuell ist diese Unstimmigkeit zwischen den beiden Methoden auf die Aktivität der AMV Reversen Transkriptase zurückzuführen, welche ein zusätzliches Adenosin an ihr Produkt anhängt (Clark, 1988). Bei der Primer Extension Methode würde dies zu einer Verlängerung des auf dem Gel sichtbaren Produkts der Reversen Transkription um 1 bp führen und somit einen 1 bp zu weit stromaufwärts liegenden Transkriptionsstartpunkt vermuten lassen. In der Praxis ist diese Verschiebung um 1 bp allerdings nur von sehr geringer Relevanz. Vielmehr bestätigen sich die Ergebnisse von 5'-RACE und Primer Extension.

Für die anderen Gene aus Tab. 4.2 wurden die Transkriptionsstartpunkte auf die selbe Weise wie für *ciaR*, *htrA* und *spr1149*, ausgehend von den stromabwärts gelegenen Genen, ermittelt. Die Promotorregionen von *ccnA-E* wurden allerdings in pPP2 kloniert, um die Transkriptionsstartpunkte ausgehend von *lacZ* zu bestimmen. Dies war notwendig, da zuvor mittels Northern Blot von M. Kovács gezeigt wurde, dass stromabwärts dieser Promotoren kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 90-150bp liegen (Halfmann *et al.*, 2007b). Ausgehend von solch kleinen Transkripten ist eine Transkriptionsstartpunktbestimmung nur schwer möglich.

In Abb. 4.8 bis 4.26 sind die Sequenzen aller in Tab. 4.2 aufgelisteten Promotoren mit den durch 5'-RACE bestimmten Transkriptionsstartpunkten und bis in die stromabwärts gelegenen Gene gezeigt. Von den 20 potentiell *cia*-regulierten Promotoren wurden bei 16

Transkriptionsstartpunkte ermittelt, welche eine Lage hatten, die etwa 8-10bp stromabwärts der in Tab. 4.2 markierten vermuteten -10 Regionen liegen. Von diesen 16 Promotoren geht also tatsächlich Transkription aus. Die für *mscL* und *arcA* ermittelten Transkriptionsstartpunkte entsprechen nicht der zuvor angenommenen Lage. Für *spr1403* und *spr0959* konnten keine Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden. Für die Gene *axe* und *malM* wurden, wie bereits für *spr1149*, zusätzlich zu den Promotoren mit potentieller CiaR-Bindestelle weitere, näher am Startcodon liegende Promotoren identifiziert, in Abb. 4.19/21/23 mit P2 gekennzeichnet.

Ein Problem bei der Identifikation der potentiell *cia*-regulierten Promotoren stellte die Annotation des Genoms von *S. pneumoniae* (Hoskins *et al.*, 2001) dar. Zum Teil wurden Transkriptionsstartpunkte bestimmt, die innerhalb eines Gens lagen, zum anderen war bei genauerer Betrachtung der Genstarts häufig keine adäquate Ribosomenbindestelle zu finden. Allerdings war oft schon wenige Basenpaare stromabwärts ein alternatives Startcodon vorhanden, im allgemeinen mit entsprechender Ribosomenbindestelle. Zudem deuteten auch Homologievergleiche auf andere Längen der Gene hin. Daher wurden, insoweit es sinnvoll erschien, die Startcodons im Vergleich zur ursprünglichen Annotation verschoben (s. Abb. 4.8-4.26).

```

ccnC

23802
CCTGAGAAATG CGCGTAACTA TGTTCGTCGT GTGAGTGAAT TGGTTGGCGT TCGTATTTCT
>.....'purA.....>

ACTTCTCAG TAGGTCCTGG TCGTGAACAA ACAAATATTT TAGAAAGTGT TTGGTCCTAA
>.....'purA.....>

GAGATTTTTA AGATTGTTT AAGATAGGTC GGGTATACTA TAGACGGTTA CAAGAAGACC
>>.....ccnC.....>

TCCTAACTTG TTGTAACAAA TATCCTAAAC TTTTCTTTTT CATAATAATC TCCCTATAGA
>.....ccnC.....>

GTCACCGCAT TCGGTGGCTT TTTTGTGTT GGGATTCAATG ATATAATAAT AAAATCGATA
>.....ccnC.....>

AGTAGGAAAA GAGAAAAGAG ATGTATTATA CGCTGAAGA AAAAGAAGTC TTTATGAGGG
>>.....spr0022'.....>
24161

```

Abb. 4.8: Promotorregion von *ccnC* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, –10 Regionen gelb, Transkriptionsstartpunkte grün. Das Startcodon von spr0022 ist fett gedruckt. Der nahe an spr0022 gelegene Transkriptionsstartpunkt wurde von M. Kovács ermittelt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

ccnE

212141
GAAGGTTAAT GGGGCTTCGT CTGTCGACTT CATCTCTCGC GGTGGACAAA TCCCAGCACC
>.....'spr0218.....>

AATTCATAGT TTTAAAAATT AAGAAAATAG GAGAAATTTT AAGTTCTATT TAAGATTAGA
>.....'spr0218.....>>

TGTGTATACT ATAATCATT AATAAAGACC TCCTAATATT ATTTGAAACA GATAACACTG
>>.....ccnE.....>

AATTAGTTTG AATTTGATTT TCATCTAATA TCTTTATTTA ATGAACTCCT AAACTTTTTC
>.....ccnE.....>

ATAATAATCT CCTTCAAAG TCGCCTGTAT GGGTGGCTTT TATTTTATCA TTCATGATAT
>.....ccnE.....>>

AATAGAAGCA AACGGAGGAC GGAAAATGGT AAAAGTACGA TTGTATTTGG TACGTCATGG
>>.....gpmB'.....>
212500

```

Abb. 4.9: Promotorregion von *ccnE* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, –10 Regionen gelb, Transkriptionsstartpunkte grün. Das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon von *gpmB* ist fett gedruckt. Der nahe an *gpmB* gelegene Transkriptionsstartpunkt wurde von M. Kovács ermittelt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

ccnA / ccnB

231001
ACCTTGGGCT TCTATCGTTC TATGGGCTTT GAAATCTTAT CCACCTATAA TTGTATAGGG
>.....'spr0237.....>

ATGACTTGGA TGAATCGTAA AAAATAACAA AACTTGTTTT TTCTTAAGCA AAATTTAAGG
>.....'spr0237.....>>

ATGGTCTAGT ATTATATAGT CTTAAATAA AGACCTCCTA ACTTTATTTA ATAAAATCCT
>>.....ccnA.....>

AAACTTTTTT CATCACAATC TCCTAATGAA GCCACCCAAT CAGGTGGCTT TTTTGCGTGG
>.....ccnA.....>>

TGAGGTGCTG GTGATAGAAA TTTTTTGCAA AATAGTAAAA TTTTAGAAAA GTTAAGCTAG

TTTAAGTTT CGTCTGTTAT CATGTAGTTA TTAATAAAG ACCTCCTAAC TTTATTTAAT
>>.....ccnB.....>

AAAATCCTAA ACTTTTCTTT TTCATAATAA TCTCCCTTAA CTCCACCCAA TCAGGTGGAG
>.....ccnB.....>

TTTTTTAGCT CTATTTCAGG CTTTTGGGGA CTATTCTAAA AATAATTTTT CGATATTTTT
>...>>

-----N600-----

CAGGTGGCTT TTTGTTTGT GGCTTGGTTT TTTTGATATAA TAGAGCCATG AGTAGAATTT
232200
TAGATAATGA GATAATGGGG GATGAGGAGT TAGTAGAACG CACGCTCCGT CCTCAGTATT
>>...ruvB'.....>

```

Abb. 4.10: Promotorregionen von *ccnA* und *ccnB* mit potentiellen CiaR-Bindestellen. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentiellen CiaR-Bindestellen sind rot markiert, -10 Regionen gelb, Transkriptionsstartpunkte grün. Das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon von *ruvB* ist fett gedruckt. Der nahe an *ruvB* gelegene Transkriptionsstartpunkt wurde von M. Kovács ermittelt. Die in pPP2 klonierten Promotorfragmente (s. 4.4) sind unterstrichen.

```

ccnD

233550
TTTGAATTTT CAAGTTCGTC CAACTCCTCA TTTCTTAGAA AATGAAGACC GAATGGAATC
>.....'spr0239.....>

CTATCAAACA CGTTTATCCA AGAAAAATTG GCAGGAGAAA TGGAAAAATT TGATTTTAA
>.....'spr0239.....>

AAATACTTAA GAAACTTTA AGCTAGGGAG TGTACTACTAA GTTCATAAGT TAAGAAGACC
>.....>>                                     >>.....ccnD.....>

TTAACTTAAA CTCCTAAAAC TTTTTCATAA TAATCTCCCT ATAAAAATAA AGTCGCCCAA
>.....ccnD.....>

TCAGGCGGCT TATTTTTTTG AAAAAATGGGC TTGGTGCCTG AGAATAAATA GCTTAGTGAT
>.....ccnD.....>>

AGAAGAAAAT GGGGAAATAT GGTATAATGA AACCATAGAT TTTTGAATAG GAATAAGATC
                                                                                   233969
ATGTTTGGAT TTTTAAAGAA AGATAAGGCT GTGGAAGTAG AGGTTCCGACA CAGGTTCCCT
>>.....uppS'.....>

```

Abb. 4.11: Promotorregion von *ccnD* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, –10 Regionen gelb, Transkriptionsstartpunkte grün. Das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon von *uppS* ist fett gedruckt. Der nahe an *uppS* gelegene Transkriptionsstartpunkt wurde von M. Kovács ermittelt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

manL

263339
TAAATAAGAA TTCAAGATTA CTA CTCAAAA ACTCAACATA TCAACATATA AAAATAAAAA
ATTTATCTT AAGTTCTAAT GATGAGTTTT TGAGTTGTAT AGTTGTATAT TTTTATTTTT

TTTTTATGA TAAATAGTTG CTTTTTTTAT GAAAACGGTT TACTACTTAA CAGTCTTAAA
AAAAAATACT ATTTATCAAC GAAAAAATA CTTTTGCCAA ATATGAATT GTCAGAATT

                                                                                   263160
GTTTTCTTAA ATGAAAATA AAACAAAAAA GGAGGAATGA CAATAATGAG TATCGGAATC
CAAAAGAATT TACTTTTGAT TTTGTTTTTT CCTCCTACT GTTATTACTC ATAGCCTTAG
>>.....manL'.....>

```

Abb. 4.12: Promotorregion von *manL* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die –10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün, die –35 Region grau und das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.


```

ciaR

707151
GAAGCAGTTG TTCTTCAATA CGGAAATGCA TAAATAAGCC TAAAATAAAA AGAAAACCTCA
>.....'pepN.....>>

GCTATCTCAT GTAAAATGCA GAGAGTTGAG TTTT'TTTAA GGCAAATTG GTATAATAGT
_____
707330
TTTATAAGG AGGAGTTTCT CATGATAAAA ATCTTATTGG TTGAGGATGA CCTAGGTCTG
>>.....'ciaR'.....>

```

Abb. 4.13: Promotorregion von *ciaR* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

spr0782

780980
TTCTCACGCT TTCTAAAATC ACTTCCTCTA TTGTATCATG AAACGGAGCT TGCACAAGA
_____

AAGGAAAATT TCTCTTTT TT TAAGATTTT TTTAAAGAAAC AGAGTATAAT AAATCATAT
_____
780801
CAAAGGAGAG AATGTATGTC TAACTATCGT AGAACTTCAA AACCAAAAAC AGAACACATC
>>.....'spr0782'.....>

```

Abb. 4.14: Promotorregion von *spr0782* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

ppmA

875071
TCACCGCAAC ATTAGTGCCT TTAGGAGATG GTATTCTCAT GCTTCGTAAA AATGTAGCAG
>.....'spr0883.....>

ATGTTCAACT GTCTGAAAGC GAATGATTTT CAGAAAAATT TAAGAAAAAA TAGTAAAATA
>.....'spr0883.....>

GATAGATTA CACTTATCTC AAAGGAGTAG ACATGAAGAA AAAATTATTG GCAGGTGCCA
_____
875250
>>.....'ppmA'.....>

```

Abb. 4.15: Promotorregion von *ppmA* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

mscL

903760
CAAATATTCA TTATTATCAT CAATTATATC TTGAGCAAGG TCTATATTTT TAGAAAATAA
>.....'mesH.....>>

TGCTCCATTT ATGAGCCTTT TAATTGCCTT CTATAATGAT TTAGGATACA ATGAAACACG
                                                                                      903581
AAACATTGAA AGGAAAACAG TATGTTAAAA AATCTAAAAT CGTTCTTGCT TCGAGGAAAT
>>.....mscL'.....>

```

Abb. 4.16: Promotorregion von *mscL* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

spr0931

916051
AATGGAGGAA ACTATTATTA TTCTAGACAG GTACGACTTA ACCTTTACAT CATCAAATGT
>.....'spr0930.....>>

TTCACTCTCT TTTCAACATC TGGCTAGACC AGGTGTTTTT GTTATAAGTT TTCTTTAAGA
>.....'spr0930.....>>

TAGATATATACTCTAAAGA AGTAAGGAG GAAATCCCT ATGAGAAAGA AACTCTTTCT
                                                                                      916230
>>.....spr0931'.....>

```

Abb. 4.17: Promotorregion von *spr0931* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

spr0959

939881
CAGAAGGATT AGAGAATTTA CAGGAACAGT ACCATGCTTT CCAAGAAGAA CGAGATAAGG
>.....relaxase-truncation.....>>

ATAAAGTATC CACTGAAGAG ATTGAGGAAG CCTTTAAGAC ATTTAAGAG CCTTTAAGAC
>.....relaxase-truncation.....>>

ATTTAAGGAA AAATGAGATA CCGTTCGTGA ATTTGAAGTG GAACTTGCAG AGAACCAAAT
>.....relaxase-truncation.....>>

AGAGAAGCTA GTTGATAAGG GCGTCTATAT CAAGGTGTCT TTCGGTGTCA AATAGAGCGG
>> relaxase-truncation
                                                                                      940180
TCTTATTTTC ATTCCCAACT ATCAATTTGGA TATTATGGAA GAAGAAAATC ATAAAAATA
>>.....spr0959.....>

```

Abb. 4.18: Region stromaufwärts von *spr0959* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, eine potentielle -10 Region gelb. Ein Transkriptionsstartpunkt konnte für dieses Gen nicht ermittelt werden. Das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

spr1149

1151340
ATATCATAAA GTTAGCTAAT AAGAAATGAA GGCAGTAAG TCAAGTAATC ACTTTGAAGT
_____
                                P1
TTCAAATCTT AAGT TTTAAG TTTTC TTTAA GAAAGTATA T TATTCTGAA GGA CTCTAAA
_____

ATTTTCGCAGC CATTATTAG TAATTGCTAC AGAATTCCTA GTCATTACTA GAAATGGACT
_____

AGTTTCTTTG AATAATAGAA CTGCATAATT CTCCTATTCT AGAAGGGGAG GACCAGTATT
_____

                                P2
TCTTTTATGA TAGGACTAGA TTG TGGTATA ATAGAGAA TAAGTTTTTT TAGTAAGACA
_____

                                1150981
AAGGAGAAAA TAGATGATTT ATGCAGGAAT TCTTGCCGGT GAACTGGCA CACGCATGGG
>>.....spr1149'.....>

```

Abb. 4.19: Promotorregion von spr1149 (*lic*) mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, –10 Regionen gelb, die –35 Region grau, Transkriptionsstartpunkte grün und das Startcodon ist fett gedruckt. Der Promotor mit potentieller CiaR-Bindestelle ist mit P1 markiert. In pPP2 klonierte Promotorfragmente (s. 4.4) sind unterstrichen.

```

spr1403

1388140
CTCATACGGG TATTCCTCC ATAATTCATT ATATCTTTTT TTGTCTAAGT AGTATAAAAA
<<.....spr1404' ' '.....<<

AATTAGAGCA AGAAAATTGT CGTTAGTAAT CGGAAAATT AGAATAA TAT AAGTGGCT TT
_____

T AAG TGCAA AACAGAA TAT ATTAATTGTT CAGAAAATAT TGATTAATGC CTCAAATAGT
_____

                                1387901
TGTACATTGT AACTATAAAA ATACTATCTA GGAGTTTAAA ATGAAACATT CACATAAAAA
>>....spr1403'.....>

```

Abb. 4.20: Region stromaufwärts von spr1403 mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, eine potentielle –10 Region gelb. Ein Transkriptionsstartpunkt konnte für dieses Gen nicht ermittelt werden. Das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

axe

1520800
GCTACATTAG TTCTATAGAA GCTTGGCAAG AAGATCCAGA GTGGCGCATG ATTGCCCTTC
>.....'recG.....>

ATCTGGAAAA GAAAGAACAT CTGGATTAAG CTTTCTCTAA GGAAAACTTA AGCTAGTTT
>.....'recG.....>
      P1
TAGGTTTGGC TCTTATACTA AAGTCTTCAA AAAGAAACGA GGACTCTCAT ATGACAGTAA
>>.1538a.>

CGATTAAAGT AAATTACCAA ACCACTTTCC AAAAGAAGGA AGCAAAAAAC TAGTATAAAC
>.....1538a.....>

AGAAGAGAGA GCGAAATGCT CTTTTTCGTT TCTAAACTA CTTTCAGCCC ATCATCCTAA

AAGTAAAGAA TCTAAATTCA CTTTCTATTT ATCCTTCTTT CTTGCATTGA TTACATAGAT
      P2
ATGCTACAGT TGTGGTACG ATTACAAAAT AAAAGGAGCA TGCTATGAAA AATCCAGCTT
>>....axe'.....>
1520381

```

Abb. 4.21: Promotorregion von *axe* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, -10 Regionen gelb, die -35 Region grau, Transkriptionsstartpunkte grün. Startcodons sind fett gedruckt. Der Promotor mit potentieller CiaR-Bindestelle ist mit P1 markiert. Ein von Hoskins *et al.* (2001) nicht annotiertes Peptid ist mit 1538a gekennzeichnet. In pPP2 klonierte Promotorfragmente (s. 4.4) sind unterstrichen.

```

spr1787

1760570
CCCTTATGGC TGAAAGTGCA GACCAGTTGG TCCATATTAG CATGAAGGGG CAGGCCGAGA
>.....'yjfA.....>

GTTTGAATGT TGCAGTTGCA GCCGGTATTT TAATCTTCCA TTTAAGCTAA TTTAACTTT
>.....'yjfA.....>
1760391
TTTGTTATA ATCAAGGAA GATGTTTACA GAAAAGGAGA AAAGGATGAA TCACACTATT
>>..spr1787'...>

```

Abb. 4.22: Promotorregion von *spr1787* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

malM

1900100
AATTTAGATG ACATAGTGTA TTCCTCCCAA AGAATAGCAA G'TTTTATTGA TAAGGAAACG
<...malX'....<<

CAAACGTTTT CCTTTATGAG CTTAGTATAG CACAAATAGA AAACGGTTGC AAGTATTTTT

                                P1
TGTA AAAAT T TAAA AAATT TTTAAGCTTG ATTTGATAGC ATAATTTTGC ATTTTAATAG

AAGAAAAGTA TGAAATAGAT AAGAATACAG TATTTTAAAT AAAAATATAT GGAATCTGTC
TAAAGAGGGA AACCAGGAGG GGCTACCTCC CTGGTCTAA TCCCTATCTA TTTTCTATGG
ACGTTTGTGC TTTGTTACAT ATAAATTCAA GCTCCCTAAG GAGGTTTTGT ACTTTGTAGA
CTGTCTCGTG AGAGTCAAAC CTTAGGATTA GATAGTTTTA AGTTATCTTT GCTAAAATGA

GTTAGTCTCC TTA AAAAATAA TCAAAAAGT TTTTAAAAA CGCTTGCAAT TATGCTTGAA

                                P2
                                OM
AAGGAGTATA CTTATAAGTA ACGCAAACGT TTGCGTCTGC AAAATACGCA AC GTTCCATT

                                1899501
ATTTTAACAC ACGAGGTGCT ATTATGAAAA AACGTCAAAG TGGTGTGTTG ATGCACATCT
>>.....malM.....>

```

Abb. 4.23: Promotorregion von *malM* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, -10 Regionen gelb, die -35 Region grau Transkriptionsstartpunkte grün und das Startcodon ist fett gedruckt. Der Promotor mit potentieller CiaR-Bindestelle ist mit P1 markiert. Der mit P2 bezeichnete Promotor mit dunkelgrün markiertem Operator des Repressors MalR wurde bereits von Nieto *et al.* (2001) beschrieben. In pPP2 klonierte Promotorfragmente (s. 4.4) sind unterstrichen.

```

arcA-truncation

1941171
AAACATTTCT CTTTATACAG ATCCAAGTGA TAACCAGATG ATAATTGGAC ACTTTTTGGT

CATTGTATA TTTTTGAAA AATTTTTTAA AAAAATTTTA TATCCTCTTT AATAGAAGTT

TATGCATTG TATATATATA TTCCATCCTA TGTTATGTAT AATAACATAA AGTTGTGCTA

AATATCATAA TTTATATTAT TTTCCGAGAA ATTATAGCCA TTGACATTAC CTAGGAATTG

CGTTATAATA TACATCTAAG CGGTACCCAA AATGGTGCCA AGTCAA AATT TTTAAGGAGG

                                1941530
AAAATACATG TCTTCACATC CAATTCAGGT CTTCTCAGAA ATTGGGAAAC TGAAAAAAGT
>>.....arcA-truncation'.....>

```

Abb. 4.24: Promotorregion von *arcA-truncation* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün, die -35 Region grau und das Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

dlt

1974420
TTGATATTGT GTGTTTTATT ATGGGAAGAT TTACTTCCATT GTCTCCTGAA ATGGAGTTTT
GAGCAGGAT CACTCTATTT GAAAATATAC ATAGAAAAAC TGTATAATC C TTAAAATAAG
G AATTTTATTC

CTGAAATCTA TTGGAAACAT ACGGTAAACA ATTGAAAAGA TACTATATAA AGTGGTACAA
GACTTT

TGGTAGAAA ATAAGCTAGT AAGAATCACT CTTATTTTAG CGAAAAATTA CAGAAATGAA
TGGTTTTTCT TGATGAAACA GAGAAAAGAA TTGTACCTCT TTCTTGGTCG GACAGCCTTG
>>.....dltX.....>

TATTTTCTTA TCTTTCTAGG GCTGCTTTAC TTCTTTAGCT ATCTTGGTCA GGGTCAAGGA
>.....dltX.....>

AGCTTTATCT ATAATGAATT TTAACTTGAA GGAGAATCCC TATTGTGTCA AATAAACCAA
>.....dltX.....>> >>....dltA'.....>
1973941
TAGCAGATAT GATTGAAACC ATTGAGCATT TTGCTCAGAC ATAGCCTAGC TATCCTGTCT
>.....dltA'.....>

```

Abb. 4.25: Promotorregion von *dltA* und *dltX* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt (Kovács *et al.*, 2006) grün, die -35 Region grau. Startcodons sind fett gedruckt. Ein von Hoskins *et al.* (2001) nicht annotiertes Gen ist als *dltX* gekennzeichnet. Das Startcodon von *dltA* wurde entsprechend Kovács *et al.* (2006) verändert, ein Stoppcodon in *dltA* ist rosa markiert. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

```

htrA

2036250
TTTTACATC TTATTCACAA AATAAAAAAT AGATTTCAAT TAAGAAAATC ACAATTTCAA
AAGAGTTATC CACAGTTTGT GTAAAACTTT TGTGTTTAAG TTATAATTAA GCTAGTCAGT
2036429
TTATACTTTC AGTAAATCAA ACATATGGAG GCAAATATGA AACATCTAAA AACATTTTAC
>>.....htrA'.....>

```

Abb. 4.26: Promotorregion von *htrA* mit potentieller CiaR-Bindestelle. Die Positionen der ersten und der letzten gezeigten Basen im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind angegeben. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün und das im Vergleich zur originalen Annotation (Hoskins *et al.*, 2001) veränderte Startcodon ist fett gedruckt. Das in pPP2 klonierte Promotorfragment (s. 4.4) ist unterstrichen.

4.4 *In vivo* Analyse potentiell *cia*-regulierter Promotoren

Um die in 4.3 identifizierten Promotoren mit potentieller CiaR-Bindestelle auf ihre *cia*-abhängige Aktivität hin zu überprüfen, wurden sie in das Promotor-Probe-Plasmid pPP2 (s. 4.1) kloniert. Die dabei verwendeten Promotorfragmente sind in Abb. 4.8-4.26 markiert. Die mit *SphI* und *BamHI* Schnittstellen klonierten Fragmente mit Größen zwischen etwa 100-160 bp enthielten alle die vermutete CiaR-Bindestelle, die -10 Region und einige wenige Basen stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts. Die Reporterkonstrukte wurden in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* mit inaktiviertem *cia*-System und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*}, einen Stamm mit aktiverem *cia*-System (Guenzi *et al.*, 1994), eingeführt. Vorangegangene Transkriptomstudien zeigten, dass während des exponentiellen Wachstums kaum Veränderungen der Aktivität des *cia*-Regulons auftreten (Heintz, 2006). Eine Aktivität *cia*-abhängiger Gene war in jeder Wachstumsphase vorhanden. In den hier vorgestellten Experimenten wurde die β -Galaktosidaseaktivität der Reporterstämme gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die ursprünglich als *cia*-reguliert vermuteten Promotoren von *arcA*, *spr1403* und *spr0959* wurden auf dieselbe Weise wie die Promotoren mit bekanntem Transkriptionsstartpunkt analysiert, um auszuschließen, dass ein methodisches Problem der 5'-RACE dafür verantwortlich gewesen sein könnte, dass bei diesen Promotoren kein Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden konnte.

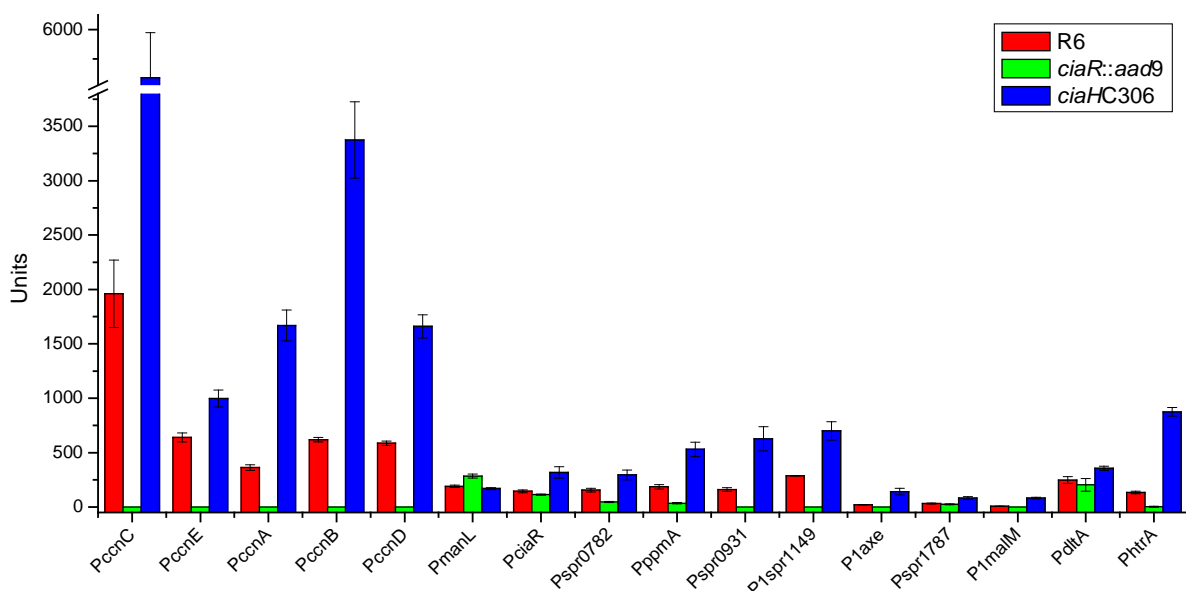


Abb. 4.27: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von potentiell *cia*-regulierten Promotoren in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*}. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in den verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen sind für den Wildtypstamm R6 rot, für *ciaR::aad9* grün und für *ciaHC306* blau dargestellt.

Tab. 4.3: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von potentiell *cia*-regulierten Promotoren in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*}.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität in		
	<i>ciaR::aad9</i>	R6	<i>ciaHC306</i>
P_{ccnC}	< 1	1960 \pm 310	5177 \pm 771
P_{ccnE}	< 1	640 \pm 42	998 \pm 78
P_{ccnA}	< 1	363 \pm 26	1669 \pm 141
P_{ccnB}	< 1	619 \pm 20	3374 \pm 350
P_{ccnD}	< 1	587 \pm 19	1661 \pm 107
P_{manL}	285 \pm 18	190 \pm 11	169 \pm 9
P_{ciaR}	114 \pm 5	145 \pm 13	317 \pm 53
P_{spr0782}	46 \pm 5	156 \pm 17	295 \pm 45
P_{ppmA}	35 \pm 6	186 \pm 21	530 \pm 66
P_{mscL}	522 \pm 81	591 \pm 3	615 \pm 98
P_{spr0931}	< 1	161 \pm 17	628 \pm 112
P_{spr0959}	< 1	< 1	< 1
P1_{spr1149}	< 1	287 \pm 1	700 \pm 84
P2_{spr1149}	n.b.	396 \pm 5	n.b.
P_{spr1403}	< 1	< 1	< 1
P1_{axe}	< 1	21 \pm 1	142 \pm 30
P2_{axe}	n.b.	50 \pm 3	n.b.
P_{spr1787}	24 \pm 5	32 \pm 4	82 \pm 14
P1_{malM}	< 1	7 \pm 2	83 \pm 8
P2_{malM}	n.b.	5 \pm 0	n.b.
P_{arcA}	< 1	< 1	< 1
P_{dltX}	203 \pm 58	247 \pm 32	357 \pm 20
P_{htrA}	3 \pm 4	134 \pm 12	875 \pm 40
P.	< 1	< 1	< 1
P_{vegW}	109 \pm 9	127 \pm 10	128 \pm 9
P_{vegM}	830 \pm 67	987 \pm 91	1122 \pm 114

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt. n.b.: nicht bestimmt.

In Abb. 4.27 sind die Aktivitäten der 16 Promotoren dargestellt, die eine *cia*-abhängige Regulation zeigten, darunter auch die schon unter 4.1 beschriebenen Promotoren P_{ciaR}, P1_{spr1149} und P_{htrA}. Die Stärke und das Maß der *cia*-Abhängigkeit variieren dabei deutlich. Auffällig ist, dass die fünf stärksten Promotoren, P_{ccnA-E}, zu kleinen nicht kodierenden RNAs gehören (Halfmann *et al.*, 2007b). Diese Promotoren zeigen zudem eine sehr ausgeprägte Abhängigkeit von CiaR, da sie in der Mutante mit inaktiviertem *ciaR* keinerlei Aktivität mehr zeigen (Tab. 4.3), ebenso wie auch P_{spr0931}, P1_{spr1149}, P1_{axe} und P1_{malM}. Auch P_{htrA} zeigt eine sehr deutlich herabgesetzte Aktivität in R6 *ciaR::aad9*.

Die Promotoren von *ciaR*, spr0782, *ppmA*, spr1787 und *dltX* zeigen zwar auch eine reduzierte Aktivität in diesem Stamm (Tab. 4.3), jedoch fallen die Aktivitätsverluste weniger drastisch aus, wie auch der Vergleich der Aktivitäten des Wildtypstammes mit der *ciaR* Deletionsmutante zeigt (Tab. 4.4). Für P_{ciaR} ist beispielsweise nur eine Reduktion der Aktivität um den Faktor 0,79 zu beobachten. Die *cia*-Abhängigkeit wird bei diesem Promotor vielmehr

Tab. 4.4: Verhältnis der Aktivitäten *cia*-regulierter Promotoren in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*}.

Promotor	Faktor der β -Galaktosidaseaktivität von	
	<i>ciaR::aad9</i> / R6	<i>ciaHC306</i> / R6
P_{ccnC}	0,001	2,64
P_{ccnE}	0,002	1,56
P_{ccnA}	0,003	4,60
P_{ccnB}	0,002	5,45
P_{ccnD}	0,002	2,83
P_{manL}	1,5	0,89
P_{ciaR}	0,79	2,19
$P_{spr0782}$	0,30	1,89
P_{ppmA}	0,19	2,85
$P_{spr0931}$	0,006	3,90
$P_{spr1149}$	0,004	2,44
P_{axe}	0,05	6,76
$P_{spr1787}$	0,75	2,56
P_{malM}	0,14	11,86
P_{dtx}	0,82	1,45
P_{htrA}	0,02	6,53

in der Mutante mit aktiverem *cia*-System (*ciaHC306*) deutlich. Hier ist immerhin ein 2,19facher Anstieg der Aktivität zu beobachten. Dieser Wert liegt in etwa auf dem Niveau des Anstiegs der beiden im Wildtyp stärksten Promotoren P_{ccnC} und P_{ccnE} .

Der Promotor P_{mscL} zeigte in den *lacZ*-Reporterassays zwar eine kräftige, aber nicht *cia*-abhängige Aktivität (Tab. 4.3). Die Regionen um die potentiellen Bindestellen vor *spr0959*, *spr1403* und *arcA* ($P_{spr0959}$, $P_{spr1403}$, P_{arcA}) zeigten unter den gewählten Wachstumsbedingungen keinerlei Aktivität, was erklärt, warum wie unter 4.3 beschrieben, die entsprechenden Transkriptionsstartpunkte nicht bestimmt werden konnten. Der etwa 50 bp vor *arcA* liegende Promotor ohne potentielle CiaR Bindestelle wurde nicht kloniert. Des weiteren wurde auch die Aktivität der näher an den Startcodons gelegenen zusätzlichen Promotoren von *spr1149* (*lic*), *axe* und *malM*, in Abb. 4.19, 4.21 und 4.23 mit P2 bezeichnet, bestimmt. Diese Promotoren, welche jeweils eine ähnlich starke Aktivität wie die *cia*-regulierten Promotoren P1 der jeweiligen Gene besitzen (Tab. 4.3), wurden lediglich in *S. pneumoniae* R6 betrachtet, da sie keine potentiellen CiaR-Bindestellen enthielten.

Um zu überprüfen, ob der in allen 16 als *cia*-abhängig reguliert identifizierten Promotorfragmenten vorkommende Repeat wesentlich für die Regulation ist, wurden veränderte Promotorfragmente von P_{manL} , P_{ccnC} und $P_{spr1149}$ in pPP2 kloniert und in *S. pneumoniae* R6 und den beiden *cia* Mutanten *ciaR::aad9* und *ciaHC306* analysiert. Für P_{manL} konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor als einziger negativ von CiaRH reguliert wird. So nimmt die Aktivität von P_{manL} in der Mutante ohne CiaR (*ciaR::aad9*) um den Faktor 1,5 zu, in

P_{manL}	ATGAAAACGG TTTATACTTA AACAGTCTTA AAGTTTTCTT AAATGAAAACCT TACTTTTGCC AAATATGAAT TTGTCA GAAT TTC AAAAGAA TTTACTTTTGA
$P_{man\Delta 1}$	ATGAAAACGG TTTATACTTA AACAGTCTTA AAGT TACTTTTGCC AAATATGAAT TTGTCA GAAT TTCA
$P_{man\Delta 2}$	ATGAAAACGG TTTATACTTA AACAGT TACTTTTGCC AAATATGAAT TTGTCA

Abb. 4.28: Promotorbereich von *manL*. Die 3'-Enden der in pPP2 klonierten Promotorfragmente sind gezeigt. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, der dritte Repeat violett, die -10 Region gelb, der Transkriptionsstartpunkt grün.

der Mutante mit aktiverem *cia*-System (*ciaHC306*) ist hingegen eine leichte Reduktion der Aktivität zu beobachten (Tab. 4.3 und 4.4). Abb. 4.28 zeigt die 3'-Enden der in pPP2 klonierten Promotorfragmente P_{manL} , $P_{man\Delta 1}$ und $P_{man\Delta 2}$. Es ist zu sehen, dass der als CiaR-Bindestelle vermutete Repeat dreimal im Promotorbereich von *manL* vorkommt. Die beiden stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts gelegenen Repeats haben dabei einen Abstand von 5 bp, der stromaufwärts gelegene Repeat ist nur weitere 4 bp entfernt. Um nun den Einfluss der Repeats auf die *cia*-abhängige Regulation zu untersuchen, wurde in dem Promotorfragment $P_{man\Delta 1}$ zunächst einer der drei Repeats deletiert, in $P_{man\Delta 2}$ wurde der Promotor nur bis 1 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts in pPP2 kloniert.

Wie in Tab. 4.5 zu sehen ist, führt bereits das Fehlen eines Repeats in $P_{man\Delta 1}$ zum Verlust der negativen *cia*-vermittelten Regulation. Der Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von P_{manL} in der *ciaR* Deletionsmutante ist bei $P_{man\Delta 1}$ und $P_{man\Delta 2}$ nicht zu beobachten. Da Veränderungen am 3'-Ende klonierter Fragmente bei transkriptionellen Reporterfusionen jedoch auch unkalkulierbare Auswirkungen haben können, kann auch dieses Ergebnis nur als weiterer Hinweis darauf dienen, dass es sich bei dem beschriebenen Repeat tatsächlich um die Bindestelle von CiaR handeln könnte.

Tab. 4.5: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von *cia*-regulierten Promotoren und ihren veränderten Derivaten.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität in		
	<i>ciaR::aad9</i>	R6	<i>ciaHC306</i>
P_{manL}	285 ± 18	190 ± 11	169 ± 9
$P_{man\Delta 1}$	177 ± 13	213 ± 20	311 ± 16
$P_{man\Delta 2}$	374 ± 29	487 ± 42	624 ± 62
P_{ccnC}	< 1	1960 ± 310	5177 ± 771
$P_{ccn\Delta G}$	< 1	1 ± 1	3 ± 2
$P_{I_{spr1149}}$	< 1	287 ± 1	700 ± 84
$P_{I_{spr1149}\Delta G}$	< 1	< 1	< 1

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

Daher wurden in die Promotorfragmente P_{ccnC} und $P_{1_{spr1149}}$ jeweils Punktmutationen eingeführt, welche zu einem Austausch der Gs zu As in der vermuteten CiaR-Bindestelle führten (Abb. 4.29). Diese Mutationen in den Promotorfragmenten $P_{ccnC\Delta G}$ und $P_{1_{spr1149}\Delta G}$ führten zu einem weitgehend kompletten Verlust der von ihnen ausgehenden β -Galaktosidaseaktivität (Tab. 4.5). Sogar in der Mutante mit aktiverem *cia*-System (*ciaHC306*) fiel die Aktivität des Promotors P_{ccnC} durch den Austausch der zwei Gs zu As in $P_{ccnC\Delta G}$ von 5177 Units auf kaum messbare 3 Units ab. Somit konnte gezeigt werden, dass der als CiaR-Bindestelle vermutete Repeat tatsächlich unbedingt notwendig für die *cia*-vermittelte Regulation und die Aktivität der beiden Promotoren P_{ccnC} und $P_{1_{spr1149}}$ ist.

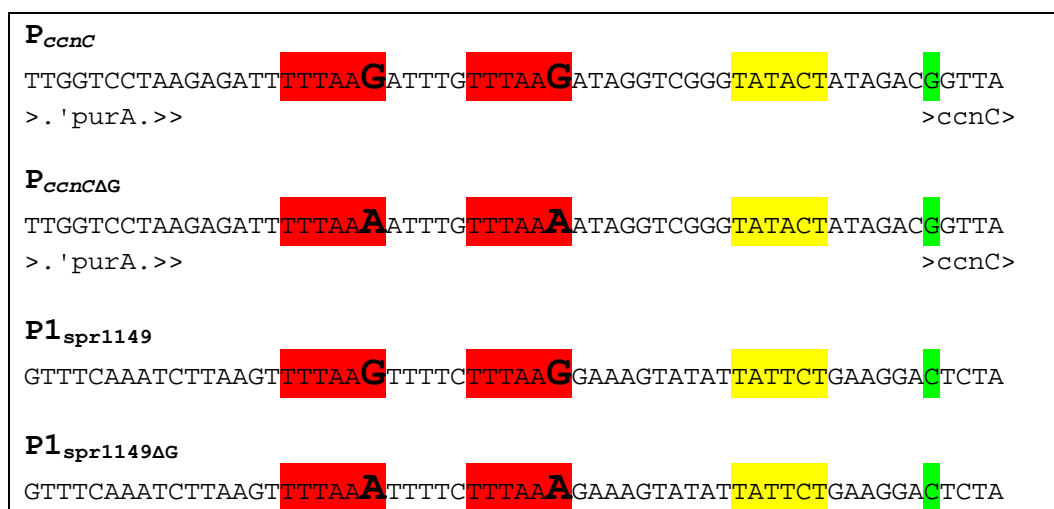


Abb. 4.29: Promotorbereiche von *ccnC* und *spr1149* mit Punktmutationen in der potentiellen CiaR-Bindestelle. Die 3'-Enden der in pPP2 klonierten Promotorfragmente sind gezeigt. Die potentielle CiaR-Bindestelle ist rot markiert, die -10 Region gelb und der Transkriptionsstartpunkt grün.

4.5 Analyse der Expression *cia*-regulierter Gene mittels Realtime RT-PCR

In Abschnitt 4.4 wurde die *cia*-abhängige Expression von Promotoren mittels β -Galaktosidaseassays untersucht, indem transkriptionelle *lacZ*-Fusionen hergestellt wurden. Da diese Fusionen nur wenige Basen stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts (s. Abb. 4.8 – 4.26) endeten, konnte in diesen Versuchen eine eventuelle posttranskriptionelle Regulation nicht erkannt werden. Daher sollte hier die Expression der Gene *spr0782*, *ppmA*, *spr0931*, *spr1149* und *htrA* mittels Realtime RT-PCR untersucht werden. Dabei könnten auch Unterschiede beispielsweise in der mRNA Stabilität zwischen *S. pneumoniae* R6 und seinen *cia* Mutanten *ciaR::aad9* und *ciaHC306* erkannt werden.

4. Ergebnisse

Dazu wurden Kulturen der drei Stämme bei einer Zelldichte von $N=70$ geerntet, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann mit genspezifischen Primern mittels Realtime RT-PCR relativ quantifiziert. Die Mengen der eingesetzten cDNA wurden dabei anhand des Gyrasegens *gyrA* normalisiert. Auf diese Weise erhielt man „Ratios“, welche einen Faktor darstellen, um den die Menge der mRNA eines Gens in einem Stamm (*ciaR::aad9* bzw. *ciaHC306*) von der Menge der mRNA in einem anderen Stamm (R6 Wildtyp) abweicht.

Tab. 4.6: Expressionsunterschiede verschiedener *cia*-regulierter Gene.

Gen	Ratio	
	<i>ciaR::aad9</i> / R6	<i>ciaHC306</i> / R6
spr0782	$0,27 \pm 0,06$	$3,30 \pm 0,38$
<i>ppmA</i>	$0,53 \pm 0,09$	$1,90 \pm 0,42$
spr0931	$0,10 \pm 0,05$	$3,39 \pm 0,11$
spr1149	$0,14 \pm 0,09$	$1,06 \pm 0,12$
<i>htrA</i>	$0,03 \pm 0,03$	$4,58 \pm 0,13$

Die angegebenen Werte geben den mittels Realtime RT-PCR ermittelten Faktor („Ratio“) an, um welchen die Menge der mRNA eines Gens zwischen *S. pneumoniae* R6 und seinen *cia* Mutanten *ciaR::aad9* und *ciaHC306* variiert. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben.

In Tab. 4.6 sind die so ermittelten Expressionsunterschiede zusammengestellt. Für spr0782, *ppmA*, spr0931 und *htrA* können sehr ähnliche Expressionsunterschiede in den *cia*-Mutanten beobachtet werden wie auch schon in den β -Galaktosidaseassays in Abschnitt 4.4. Die beiden Methoden liefern fast identische Ergebnisse. Allerdings weichen die Ergebnisse für spr1149 von denen von P1_{spr1149} in 4.4 ab. Konnte in den β -Galaktosidaseassays noch ein kompletter Aktivitätsverlust von P1_{spr1149} in der *ciaR*-Deletionsmutante beobachtet werden, so zeigen die Ergebnisse der Realtime RT-PCR nur einen Abfall der Expression um den Faktor 0,14. Ebenso lassen die Ergebnisse der Realtime RT-PCR keinen Anstieg in der Mutante mit aktiverem *cia*-System (*ciaHC306*) erkennen, welcher für P1_{spr1149} in den β -Galaktosidaseassays 2,44 betrug. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass spr1149 noch über einen zweiten Promotor verfügt (s. 4.3), dessen Aktivität für die Ergebnisse der Realtime RT-PCR im Gegensatz zu den β -Galaktosidaseassays auch eine bedeutende Rolle spielt, da hier die gesamte Transkription eines Gens betrachtet wird.

4.6 Bindung von CiaR an *cia*-abhängige Promotoren

In den vorangegangenen Abschnitten wurde erläutert, wie für 16 Promotoren von *S. pneumoniae* eine *cia*-abhängige Regulation *in vivo* gezeigt werden konnte. Auch konnte durch Mutageneseexperimente die Vermutung, dass eine direkte Regulation durch Bindung eines transkriptionellen Regulators an einen in allen 16 Promotoren vorkommenden Repeat vorliegt, untermauert werden. Einen sicheren Beweis für die direkte Regulation durch CiaR konnten diese Experimente jedoch nicht liefern. Um nachzuweisen, dass die *cia*-abhängige Regulation nicht indirekt über einen unbekanntem Regulator, sondern direkt durch Bindung von CiaR erfolgt, wurden Bandshift Assays durchgeführt. Dazu wurden in *E. coli* überexprimiertes, aufgereinigtes His₆-CiaR Protein und die Promotorfragmente, die in pPP2 analysiert wurden (s. 4.4), eingesetzt.

4.6.1 Überexpression von CiaR in *E. coli*

Zur Durchführung der Bandshift Assays wurde der Response Regulator CiaR in aufgereinigter Form benötigt. Dazu sollte zunächst ein GST-CiaR-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt werden. Der zur Aufreinigung benötigte GST-tag sollte dabei mit Hilfe des Enzyms PreScission Protease (GE Healthcare) abgespalten werden. Dies gelang jedoch unter verschiedensten Bedingungen nicht. Daher wurde CiaR als His₆-tag Protein hergestellt und über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Überexpression von His₆-CiaR wurden verschiedene *E. coli* Stämme getestet. Letztlich zeigte sich dabei der *lacI^d* Stamm *E. coli* JM109 als am besten geeignet. Abb. 4.30 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel, welches die Produktion von His₆-CiaR in *E. coli* JM109 dokumentiert. Die starke Überexpression des etwa 26,9 kDa großen His₆-CiaR nach Induktion mit IPTG ist deutlich zu erkennen.

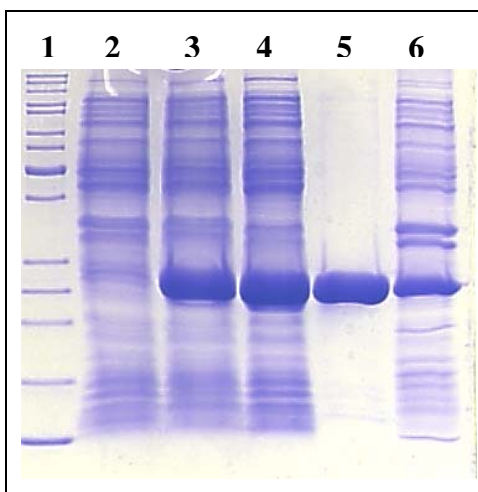


Abb. 4.30: Überexpression von His₆-CiaR in *E. coli* JM109 pQE30-*ciaR*. 12,5% SDS-Gel. Spur 1: Marker (peqGoldII; 3µl), Spur 2: Lysat vor Induktion mit IPTG, Spur 3: Lysat 20h nach Induktion, Spur 4: Überstand nach Zentrifugation der lysierten Zellen, Spur 5: Kurzbindung des Überstandes an Ni²⁺-Agarose, Spur 6: Pellet nach Zentrifugation der lysierten Zellen.

His₆-CiaR wurde durch Bindung an Ni²⁺-Agarose aufgereinigt und in Bandshift Puffer eluiert. Abb. 4.31 zeigt, dass somit sehr sauberes Protein zur Verfügung stand, welches im Folgenden für die Bandshift Assays eingesetzt werden konnte.

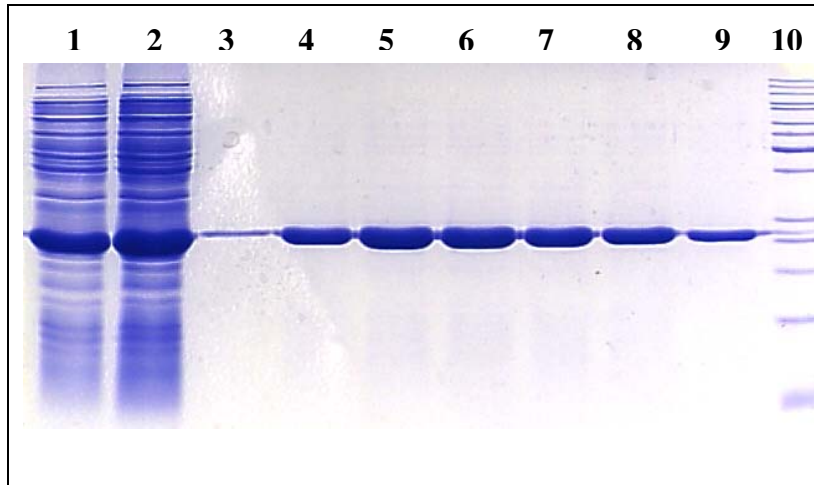


Abb. 4.31: Aufreinigung von His₆-CiaR aus *E. coli* JM109 pQE30-ciaR. 12,5% SDS-Gel, Spur 1: Überstand nach Zentrifugation der lysierten Zellen, Spur 2: Durchfluss der Ni²⁺-Agarose Säule, Spur 3-9: Fraktionen Nr. 1-7 der Umpufferung des aufgereinigten Proteins (je 3 µl), Spur 10: Marker (peqGoldII; 3µl).

4.6.2 Bandshift Assays

Um die direkte Bindung von CiaR an die vermutete Bindestelle TTTAAG-5bp-TTTAAG (s. 4.2) in den *cia*-regulierten Promotoren nachzuweisen, wurden zunächst Bandshifts mit den Promotorfragmenten P_{manL}, P_{ccnC} und P_{I_{spr1149}}, sowie deren mutierten Derivaten P_{manLΔ1}, P_{manLΔ2}, P_{ccnCΔG} und P_{I_{spr1149}ΔG} (s. 4.4) durchgeführt. Die unveränderten Promotorfragmente zeigten schon bei einer eingesetzten Proteinmenge von 0,97 µg ein deutlich verlangsamtes Laufverhalten im Polyacrylamidgel, was auf eine Bindung von His₆-CiaR schließen lässt (Abb. 4.32). Jedoch konnte dies nur beobachtet werden, wenn His₆-CiaR vor Inkubation mit den Promotorfragmenten mit Acetylphosphat inkubiert wurde, was vermutlich zur Phosphorylierung des Proteins führte (Lukat *et al.*, 1992; s. 4.9). Die Promotorfragmente P_{manLΔ1}, P_{manLΔ2}, P_{ccnCΔG} und P_{I_{spr1149}ΔG} mit Veränderungen in der vermuteten CiaR-Bindestelle (s. Abb. 4.28 und 4.29) ließen auch bei der höchsten eingesetzten Proteinmenge (1,75 µg) kein verändertes Laufverhalten erkennen, was darauf zurückzuführen ist, dass keine Bindung von His₆-CiaR stattgefunden hat. Bei P_{manLΔ1} und P_{I_{spr1149}ΔG} sind die Banden bei der höchsten Proteinmenge allerdings leicht verschwommen, was, zumindest bei P_{manLΔ1}, auf das Vorhandensein eines zusätzlichen TTTAAG Repeats zurückzuführen sein könnte. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass der in den Promotoren von P_{manL}, P_{ccnC} und P_{I_{spr1149}} vorkommende Repeat TTTAAG-5bp-TTTAAG tatsächlich die zentrale Sequenz der Bindestelle des Response Regulators CiaR darstellt.

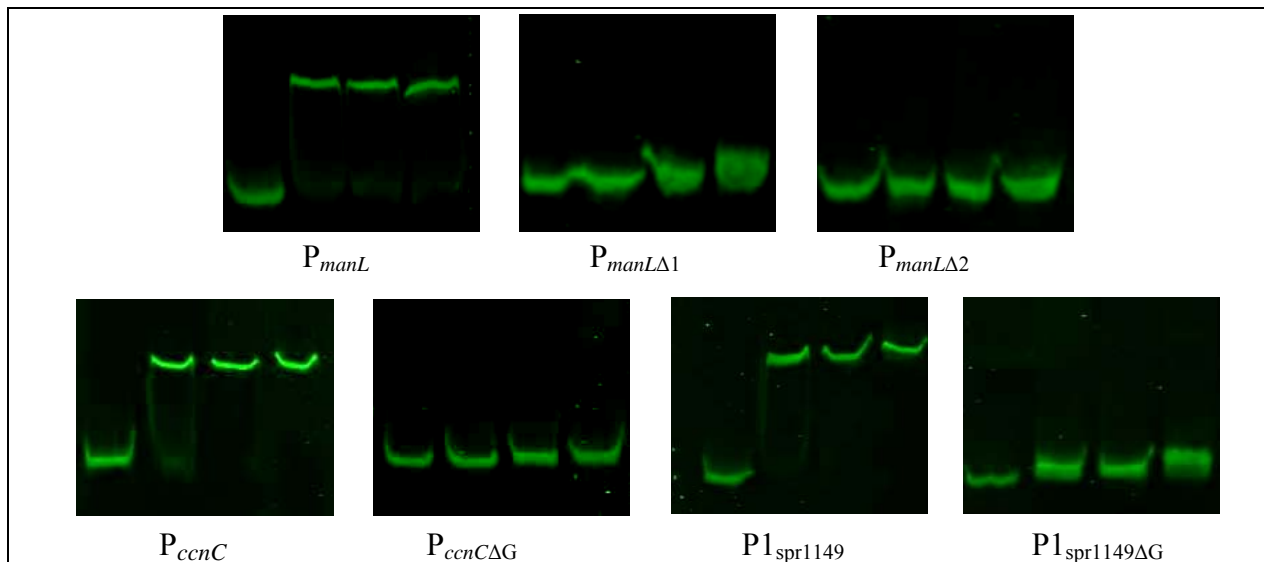


Abb. 4.32: Bandshift Assays der *cia*-regulierten Promotorfragmente P_{manL} , P_{ccnC} und $P1_{spr1149}$ und ihren mutierten Derivaten mit aufgereinigtem His₆-CiaR. Alle Spuren enthalten 5 ng DNA Fragment. In jedem Gel enthält Spur 1 kein Protein, Spur 2 0,97 μg, Spur 3 1,36 μg und Spur 4 1,75 μg. Die Gele (8 % PAA) wurden mit SYBR GreenI angefärbt und die Fluoreszenz mit einem FluorImager detektiert.

Die anderen Promotorfragmente, deren Aktivität in β -Galaktosidaseassays analysiert wurde (s. 4.4), wurden ebenfalls in Bandshiftexperimenten eingesetzt. Dabei zeigten alle Fragmente, die zuvor eine *cia*-abhängige Aktivität zeigten, auch ein verlangsamtes Laufverhalten nach Inkubation mit His₆-CiaR (Abb. 4.33). Jedoch zeigt die Bindung je nach Fragment eine unterschiedliche Effizienz. Ist schon bei der geringsten eingesetzten Proteinmenge bei P_{ccnA} , P_{ccnB} und P_{ccnD} , bei höheren Proteinmengen auch bei P_{ccnE} , P_{ppmA} , $P_{spr0931}$, $P1_{axe}$ und P_{htrA} ein deutlicher Shift zu erkennen, so zeigen vor allem P_{ciaR} , $P1_{malM}$ und P_{dltX} ein anderes Verhalten. P_{ciaR} zeigt nur bei höheren Proteinmengen ein Hochrutschen der Bande. Diese ist zudem sehr unscharf, was auf eine geringe Stabilität der Bindung von His₆-CiaR an dieses DNA-Fragment hindeutet. Unscharfe Banden lieferten auch die Bandshift Assays mit $P_{spr0782}$, $P_{spr1787}$ und $P1_{malM}$. Bei $P1_{malM}$, wie auch bei P_{dltX} , ist der Shift zusätzlich weniger stark ausgeprägt als bei den anderen Promotorfragmenten. P_{ciaR} , $P_{spr0782}$, $P_{spr1787}$, $P1_{malM}$ und P_{dltX} zeigten bereits in den β -Galaktosidaseassays eine weniger starke Abhängigkeit vom Vorhandensein des Regulators CiaR (Tab. 4.4).

Die Promotorfragmente $P_{spr1403}$, P_{arcA} und P_{vegM} ließen keinerlei Bindung von His₆-CiaR erkennen (Abb. 4.34). $P_{spr0959}$, der zuvor keine Aktivität zeigte, wurde hingegen von His₆-CiaR gebunden. Jedoch scheint diese Bindung deutlich weniger effektiv zu sein als bei den meisten *cia*-regulierten Promotorfragmenten (Abb. 4.32, 4.33).

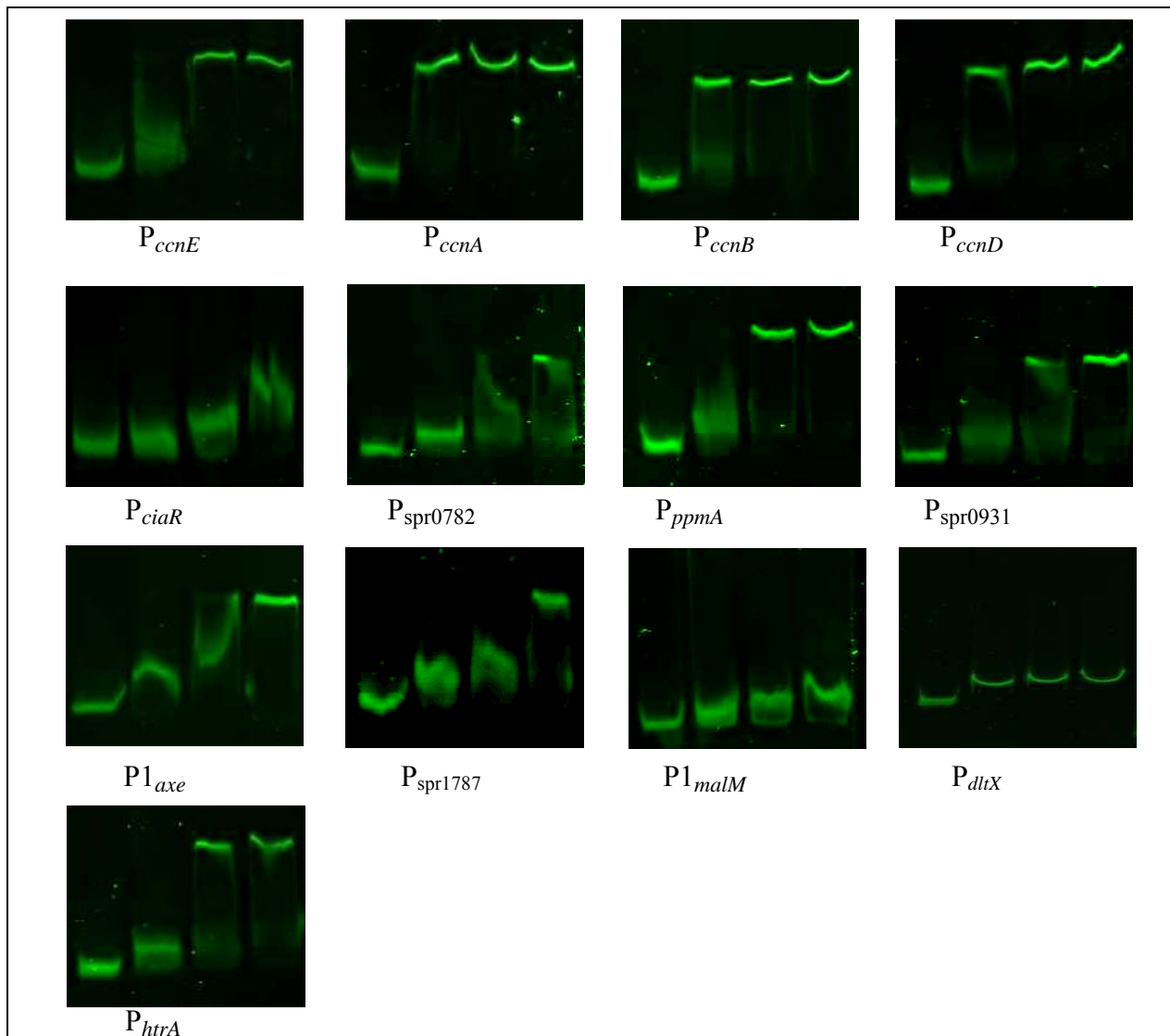


Abb. 4.33: Bandshift Assays *cia*-regulierter Promotorfragmente mit aufgereinigtem His₆-CiaR. Alle Spuren enthalten 5 ng DNA Fragment. In jedem Gel enthält Spur 1 kein Protein, Spur 2 0,97 µg, Spur 3 1,36 µg und Spur 4 1,75 µg. Die Gele (8 % PAA) wurden mit SYBR GreenI angefärbt und die Fluoreszenz mit einem FluorImager detektiert.

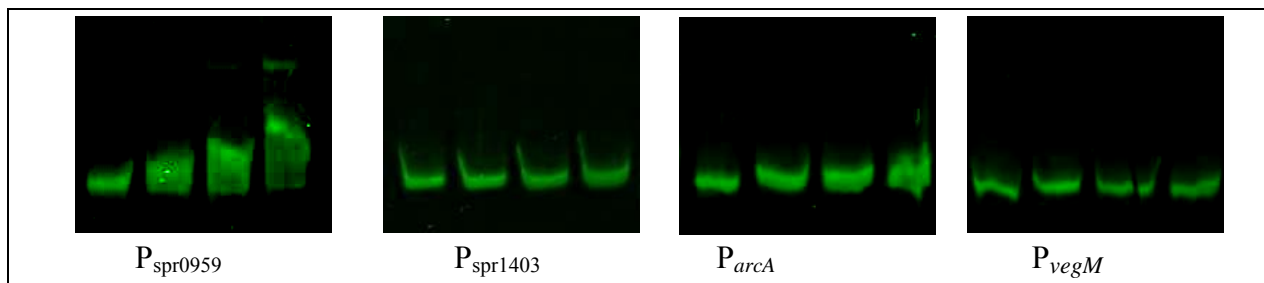


Abb. 4.34: Bandshift Assays nicht *cia*-regulierter Promotorfragmente mit aufgereinigtem His₆-CiaR. Alle Spuren enthalten 5 ng DNA Fragment. In jedem Gel enthält Spur 1 kein Protein, Spur 2 0,97 µg, Spur 3 1,36 µg und Spur 4 1,75 µg. Die Gele (8 % PAA) wurden mit SYBR GreenI angefärbt und die Fluoreszenz mit einem FluorImager detektiert.

4.7 Die Gene des CiaRH-Regulons

Die zuvor dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die Bindestelle des Response Regulators CiaR von *S. pneumoniae* R6 ein direkter Repeat mit der Sequenz TTTAAG-N₅-TTTAAG ist. Für 16 Promotoren mit dieser Bindestelle konnte die direkte Regulation durch CiaR gezeigt werden. Dabei sind 15 der Promotoren positiv reguliert, nur der Promotor vor *manL* wird negativ durch CiaR beeinflusst. Von den 16 Promotoren geht die Transkription von insgesamt 30 Genen aus, wobei 19 Gene in 6 Operons organisiert sind (Abb. 4.35). Unter den 30 zum *cia*-Regulon gehörenden Genen finden sich neben *ciaRH* selbst und vielen Genen, die für hypothetische Proteine ohne bekannte Funktion kodieren, auch 5 Gene von kleinen nicht-kodierenden RNAs (*ccnA-E*). Außerdem gehören die Gene der Serinprotease HtrA und des bei der Chromosomensegregation beteiligten ParB ebenso zum *cia*-Regulon wie *manLMN*, welche für ein Mannose Phosphotransferase System codieren, und das *lic1* Operon, welches für den Einbau von Cholin in die Teichonsäuren wesentliche Gene enthält. Auf die einzelnen Genprodukte wird in Teil 5 dieser Arbeit (Diskussion) genauer eingegangen werden.

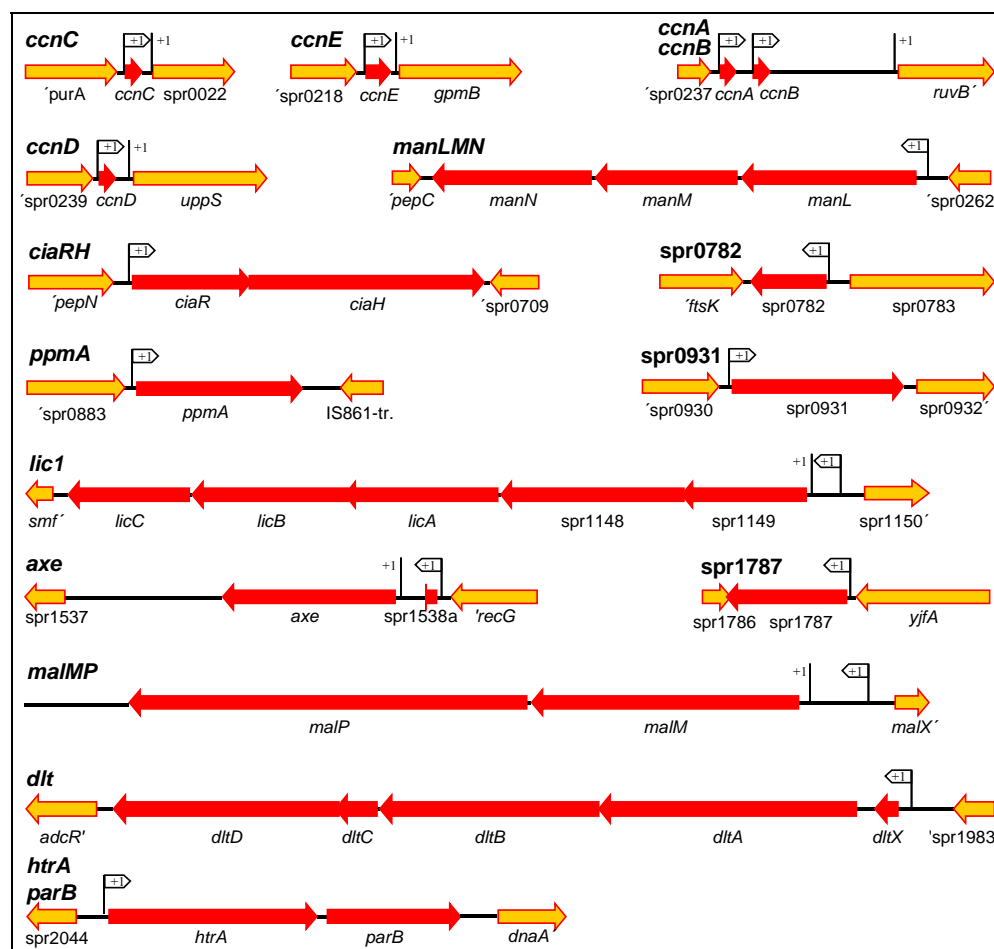


Abb. 4.35: Die Gene des CiaRH Regulons in *S. pneumoniae* R6. CiaR abhängige Gene sind rot dargestellt, flankierende Gene gelb. Promotoren mit CiaR Bindestelle sind mit einem eingetragenen **+1** markiert, andere Promotoren mit bekanntem Transkriptionsstartpunkt mit +1.

4.8 Aktivität CiaR abhängiger Promotoren unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Die bisher vorgestellten Experimente, die zur Identifizierung der Gene des CiaRH Regulons führten, wurden alle in C-Medium durchgeführt. Dabei zeigten die meisten *cia*-abhängigen Promotoren bereits im Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 eine relativ starke Aktivität. Das Regulon scheint daher in C-Medium aktiviert zu sein. In anderen Wachstumsmedien sind aber teilweise Phänotypen zu beobachten, die sich in C-Medium nicht zeigen. Beispielsweise entwickeln Wildtyp Zellen, die in THB Medium gewachsen sind, keine natürliche Kompetenz, wohingegen die Deletion von *ciaR* die Transformierbarkeit in diesem Medium wieder herstellt (Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2005). Daher stellt sich die Frage, ob unter verschiedenen Wachstumsbedingungen eventuell eine veränderte Expression der Gene des *cia*-Regulons zu beobachten ist, die mit den auftretenden Phänotypen in Verbindung gebracht werden kann.

In Abschnitt 4.4 wurde gezeigt, dass einige Promotoren eine besonders starke *cia*-Abhängigkeit zeigten. Beispielsweise zeigten die Promotoren P_{ccnA-E} , $P_{spr0931}$, $P_{I_{spr1149}}$ und P_{htrA} einen kompletten Aktivitätsverlust bei Abwesenheit von CiaR. Sollte durch andere Wachstumsbedingungen das CiaRH Zwei-Komponenten System in einem anderen Aktivierungszustand vorliegen, so sollte insbesondere an diesen Promotoren auch eine veränderte Aktivität zu beobachten sein. Um dies zu testen, wurden exemplarisch einige der besonders deutlich *cia*-regulierten Promotoren ausgewählt, um ihre Aktivität mittels β -Galaktosidaseassays zu bestimmen.

4.8.1 Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in THY Medium

Die Aktivität der Promotoren P_{ccnC} , P_{ccnA} , $P_{I_{spr1149}}$ und P_{htrA} in *S. pneumoniae* R6 in THY-Medium (THB-Medium mit 0,5% Hefeextrakt) wurde wie in 4.4 in C-Medium gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt (Abb. 4.36). Zur Kontrolle wurde auch die Aktivität des nicht regulierten Kontrollpromotors P_{vegM} gemessen. Die Aktivität aller getesteten Promotoren weicht in THY-Medium kaum von der Aktivität in C-Medium ab. Die Veränderungen bleiben stets deutlich unterhalb eines Faktors von zwei (Tab. 4.7). Für P_{htrA} ist die Veränderung mit einem 1,6fachen Anstieg in THY-Medium am höchsten. Ob diese geringen Veränderungen in der Expression alleine für den Phänotyp des Kompetenzverlusts verantwortlich sind bleibt daher fraglich.

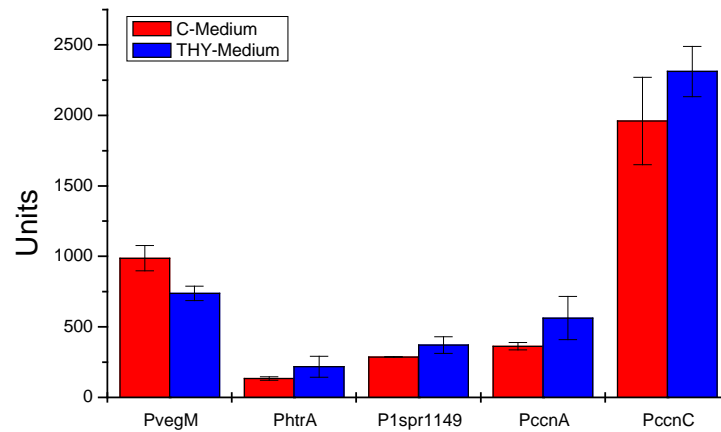


Abb. 4.36: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in THY Medium. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in *S. pneumoniae* R6 sind rot für C-Medium und blau für THY-Medium dargestellt.

Tab. 4.7: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von CiaR abhängigen Promotoren in THY Medium.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		THY / C
	C-Medium	THY-Medium	
P _{vegM}	987 ± 91	737 ± 51	0,75
P _{htrA}	134 ± 12	217 ± 75	1,62
P _{1spr1149}	287 ± 1	371 ± 59	1,29
P _{ccnA}	363 ± 26	562 ± 153	1,55
P _{ccnC}	1960 ± 310	2311 ± 179	1,18

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden mit *S. pneumoniae* R6 gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

4.8.2 Aktivität CiaR abhängiger Promotoren auf D-Agar

Je nachdem ob *S. pneumoniae* planktonisch oder auf einer festen Oberfläche wächst, kann sich die Expression vieler Gene verändern. Oggioni *et al.* (2006) zeigten mit Realtime RT-PCR, dass unter verschiedensten Wachstumsbedingungen große Unterschiede in der Transkription der untersuchten Gene zu beobachten sind. Beispielsweise wurden die Kompetenzgene *comA* und *comX* bei Biofilmbildung im Vergleich zu einer flüssigen Kultur deutlich stärker transkribiert. Oggioni *et al.* (2006) untersuchten auch die Expression einiger Gene bei Wachstum auf Agar. Dabei zeigten sich auch Unterschiede in der Transkription einiger Gene. Unter anderem wurde *ciaR* auf Agar 1,9fach stärker transkribiert als in Flüssigmedium. Wie zuvor (s. 4.4) gezeigt wurde, ist in *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} die Aktivität des Promotors von *ciaR* auch etwa 2fach erhöht. Die Aktivität der CiaR unterstellten Promotoren ist in diesem

4. Ergebnisse

Stamm aber teilweise fast bis zu 12fach höher als im Wildtyp. Daher wurde mittels β -Galaktosidaseassay exemplarisch für einige Promotoren des CiaRH Regulons überprüft, ob auf Agar eine Veränderung der Aktivität im Vergleich zu Flüssigmedium auftritt.

Dazu wurden in C-Medium logarithmisch wachsende Zellen auf D-Blutagar so ausplattiert, dass am nächsten Tag ein dichter Zellrasen auf der Agarplatte gewachsen war (s. 3.22.2). Die Zellen wurden abgeschwemmt und in β -Galaktosidaseassays eingesetzt. Abb. 4.37 zeigt die Ergebnisse dieses Assays im Vergleich mit den Ergebnissen in Flüssigkultur (C-Medium).

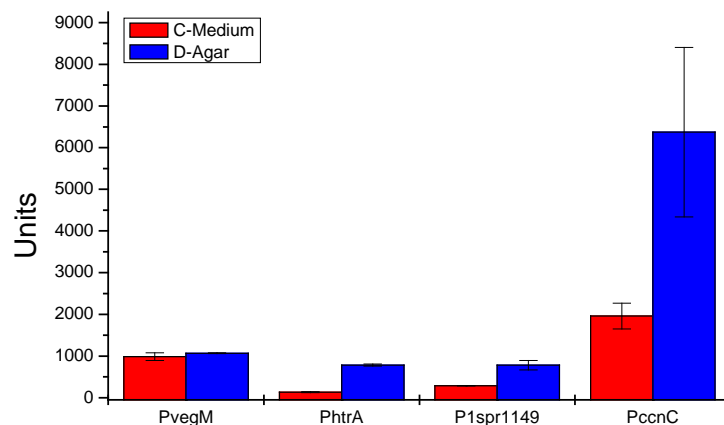


Abb. 4.37: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren auf D-Agar. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in *S. pneumoniae* R6 sind rot für C-Medium und blau für D-Agar dargestellt.

Während der nicht regulierte Kontrollpromotor P_{vegM} keine Veränderung seiner Expression auf D-Agar zeigt, sind die *cia*-abhängigen Promotoren P_{ccnC} , $P_{1spr1149}$ und P_{htrA} zwischen 2,7-5,8fach aktiver als in C-Medium (Tab. 4.8). Das CiaRH Regulon scheint daher deutlich aktiver zu sein, wenn *S. pneumoniae* auf einer festen Oberfläche wächst. Allerdings bestehen in der Zusammensetzung von C-Medium und D-Agar gravierende Unterschiede, so dass die höhere Aktivität auch durch Komponenten des D-Agars verursacht sein könnte. Es wäre deshalb sinnvoll, die Aktivität der Promotoren zwischen D-Agar und D-Medium oder beispielsweise auch zwischen THB-Medium und THB-Agar zu vergleichen. In diesem Fall auftretende Aktivitätsunterschiede könnten dann tatsächlich ausschließlich auf den Unterschied zwischen flüssigem und festem Medium zurückgeführt werden. Sollten die Veränderungen in diesen Experimenten ebenso deutlich sein wie die hier ermittelten, wäre es dann auch von Interesse, andere Wachstumsbedingungen, wie beispielsweise die Biofilmbildung, hinsichtlich der Aktivität des CiaRH Regulons zu untersuchen.

Tab. 4.8: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von CiaR abhängigen Promotoren auf D-Agar.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		D / C
	C-Medium	D-Agar	
P_{vegM}	987 \pm 91	1068 \pm 8	1,08
P_{htrA}	134 \pm 12	783 \pm 23	5,84
$P_{I_{spr1149}}$	287 \pm 1	782 \pm 114	2,72
P_{ccnC}	1960 \pm 310	6372 \pm 2030	3,25

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden mit *S. pneumoniae* R6 durchgeführt.

4.9 Phosphorylierung des Response Regulators CiaR

Die prinzipielle Funktionsweise eines Zwei-Komponenten Systems beinhaltet die Phosphorylierung des Response Regulators durch eine Histidinkinase, was eine Veränderung seiner DNA-Bindeigenschaften auslöst. Insofern es sich dabei um einen positiven transkriptionellen Regulator handelt, bindet dieser daraufhin in der Promotorregion eines Gens, was wiederum zu dessen verstärkter Transkription führt.

Auch CiaR scheint für die Bindung an seine Bindestelle phosphoryliert sein zu müssen. Wie Abb. 4.38 zeigt, kann eine effiziente Bindung von His₆-CiaR nur detektiert werden, wenn das Protein vor Inkubation mit dem DNA-Fragment P_{ccnC} mit CiaR Bindestelle mit Acetylphosphat inkubiert wird. Dies wurde auch bereits bei den in Abschnitt 4.6 gezeigten Bandshifts beobachtet. Eine höhere Spezifität einer *in vitro* Bindung durch Phosphorylierung mit Acetylphosphat zeigen auch andere Regulatoren der OmpR Klasse, zu der CiaR gehört (Lange *et al.*, 1999; Depardieu *et al.*, 2005; Gusa *et al.*, 2006). In den folgenden Abschnitten soll daher genauer auf die Vorgänge bei der Phosphorylierung von CiaR eingegangen werden. Es wird untersucht, wo die Phosphorylierung in CiaR stattfindet und woher *in vivo* das auf CiaR übertragene Phosphat stammt.

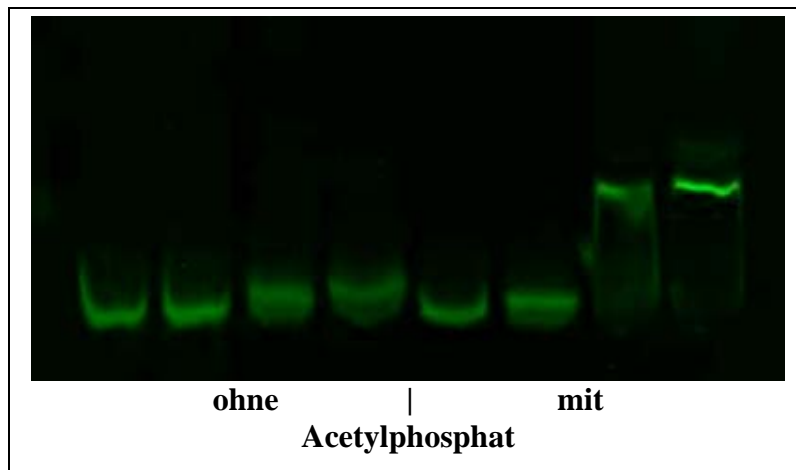


Abb. 4.38: Bandshift Assay mit dem Promotorfragment P_{ccnC} mit aufgereinigtem His₆-CiaR mit und ohne Inkubation mit Acetylphosphat. Alle Spuren enthalten 5 ng des Promotorfragments P_{ccnC} . Spur 1 und 5 enthalten kein Protein, Spur 2 und 6 0,38 μ g His₆-CiaR, Spur 3 und 7 0,67 μ g His₆-CiaR und Spur 4 und 8 0,96 μ g His₆-CiaR. Das in Spur 2-4 eingesetzte His₆-CiaR wurde wie unter 3.25 beschrieben behandelt, außer dass kein Acetylphosphat in die Phosphorylierungsreaktion gegeben wurde. Das Gel (8% PAA) wurde mit SYBR GreenI angefärbt und die Fluoreszenz mit einem FluorImager detektiert.

4.9.1 Effekte des Aminosäureaustauschs D51A in CiaR

Von vielen Response Regulatoren der OmpR Klasse, wie beispielsweise OmpR aus *E. coli*, PhoP aus *B. subtilis* und CovR aus *S. pyogenes*, ist bekannt, dass eine Phosphorylierung an einem konservierten Aspartat an Position 53 bzw. 55 der Response Regulatoren stattfindet (Delgado *et al.*, 1993; Dalton und Scott, 2004; Eldakak und Hulett, 2007). Um CiaR genauer zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob auch in diesem Response Regulator die Phosphorylierung an dem entsprechenden Aspartat stattfindet. Das Alignment von CiaR mit OmpR, PhoP und CovR in Abb. 4.39 zeigt, dass ein Aspartat an Position 51 (D51) in CiaR dem Aspartat an Position 53/55 in OmpR bzw. PhoP und CovR entspricht.

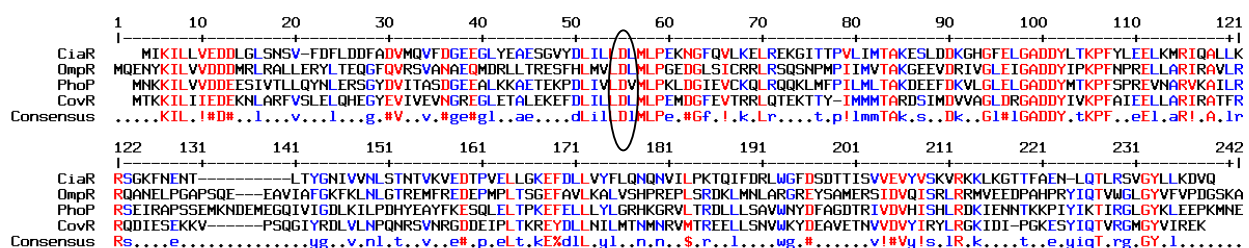


Abb. 4.39: Alignment der Response Regulatoren CiaR (*S. pneumoniae*), OmpR (*E. coli*), PhoP (*B. subtilis*) und CovR (*S. pyogenes*). In allen Regulatoren identische Aminosäuren sind rot dargestellt. Das Aspartat (D51/53/55) an dem in OmpR, PhoP und CovR die Phosphorylierung stattfindet ist markiert. Das Alignment wurde mit MultAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) angefertigt.

Mit Hilfe der Janus Kasette (Sung *et al.*, 2001) wurde, analog zu den Experimenten in *S. pyogenes* (Dalton und Scott, 2004) und *E. coli* (Delgado *et al.*, 1993) das Aspartat an Position 51 von CiaR in *S. pneumoniae* R6 gegen ein Alanin ausgetauscht (*S. pneumoniae* R6 CiaRD51A). Sollte dieser Aminosäureaustausch tatsächlich dazu führen, dass CiaR nicht mehr phosphoryliert werden kann, dann sollten Promotoren, die eine starke CiaR Abhängigkeit *in vivo* zeigten (s. 4.4), eine herabgesetzte Aktivität in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A haben. Um dies zu überprüfen, wurde die Aktivität von P_{htrA} , P_{ccnC} , $P_{spr0931}$ und des Kontrollpromotors P_{vegM} mittels β -Galaktosidaseassays in diesem Stamm bestimmt. Abb. 4.40 zeigt, dass die *cia*-abhängigen Promotoren P_{htrA} , P_{ccnC} und $P_{spr0931}$ in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A einen nahezu kompletten Aktivitätsverlust im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 aufweisen, während die Aktivität von P_{vegM} nahezu unverändert bleibt. Allerdings bleibt bei P_{htrA} und P_{ccnC} eine geringe Restaktivität erhalten (Tab. 4.9). In dem Stamm mit deletiertem *ciaR* zeigte P_{ccnC} keinerlei Aktivität (Tab. 4.3), im Gegensatz zu 25 Units in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A (Tab. 4.9).

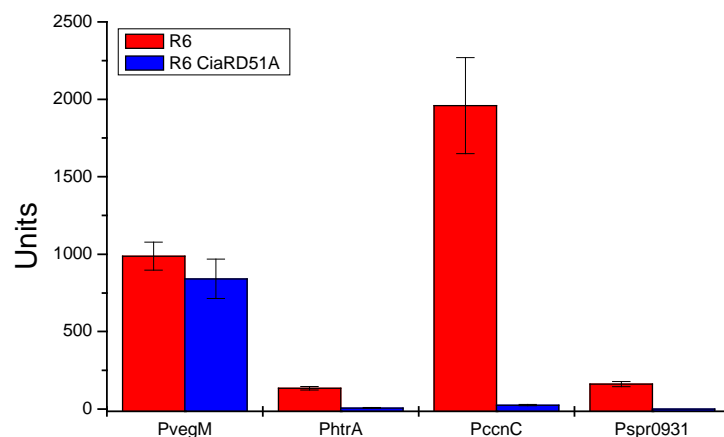


Abb. 4.40: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in C-Medium sind rot für *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und blau für *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A dargestellt.

Tab. 4.9: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von CiaR abhängigen Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		CiaRD51A / R6
	R6	CiaRD51A	
P_{vegM}	987 \pm 91	841 \pm 127	0,85
P_{htrA}	134 \pm 12	7 \pm 3	0,05
P_{ccnC}	1960 \pm 310	25 \pm 4	0,01
$P_{spr0931}$	161 \pm 17	< 1	0,01

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

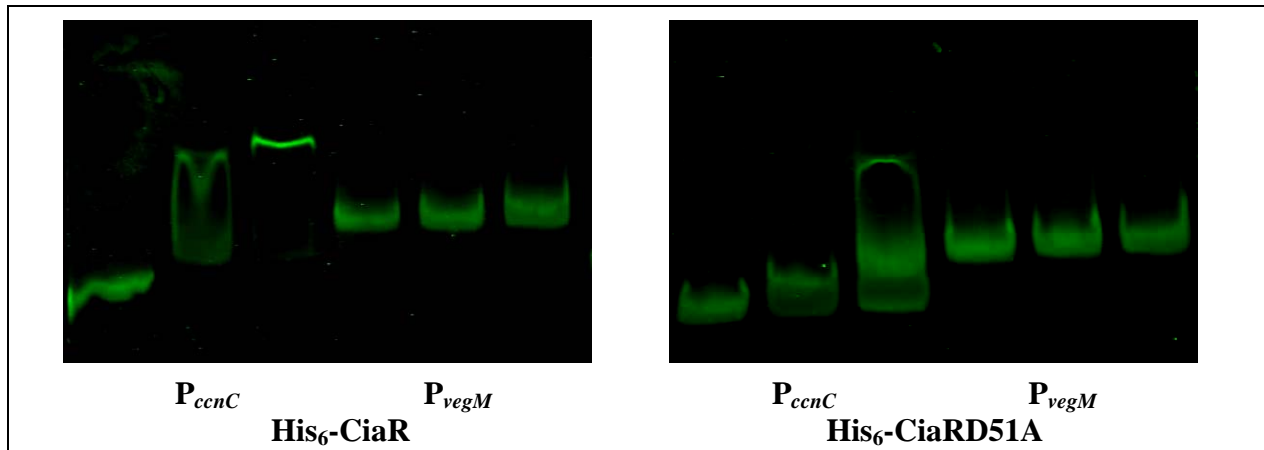


Abb. 4.41: Bandshift Assays mit den Promotorfragmente P_{ccnC} und P_{vegM} mit aufgereinigtem His₆-CiaR und His₆-CiaRD51A. Alle Spuren enthalten 5 ng DNA Fragment. In jedem Gel enthalten Spur 1 und 4 kein Protein, Spur 2 und 5 1,36 µg, Spur 3 und 6 2,14 µg. Die Gele (8% PAA) wurden mit SYBR GreenI angefärbt und die Fluoreszenz mit einem FluorImager detektiert.

Der Einfluss des Aminosäureaustauschs D51A in CiaR wurde auch *in vitro* mittels Bandshift Assays untersucht. CiaRD51A aus *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A wurde dazu analog zu CiaR aus *S. pneumoniae* R6 als His₆-tag Protein in *E. coli* JM109 überexprimiert (vgl. 4.6.1). Das aufgereinigte Protein His₆-CiaRD51A wurde mit den Promotorfragmenten P_{ccnC} bzw. P_{vegM} nach Inkubation mit Acetylphosphat zusammengegeben. His₆-CiaRD51A zeigte, wie auch His₆-CiaR, keine Bindung an die Negativkontrolle P_{vegM} (Abb. 4.41). Das Bindungsverhalten der beiden Proteine an P_{ccnC} ließ hingegen deutliche Unterschiede erkennen. Während His₆-CiaR bereits bei 1,36 µg Protein im Bandshift Ansatz ein deutlich verlangsamtes Laufverhalten von P_{ccnC} verursachte, bindet His₆-CiaRD51A auch bei 2,14 µg Protein im Ansatz nur einen kleinen Teil der vorhandenen DNA. Somit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Aktivität *cia*-abhängiger Promotoren in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A mit der verminderten Fähigkeit von CiaRD51A an DNA zu binden zusammenhängt.

4.9.2 Einfluss der Histidinkinase CiaH auf die Expression *cia*-abhängiger Gene

In einem typischen Zwei-Komponenten System phosphoryliert eine Histidin Kinase ihren zugehörigen Response Regulator, so dass dieser Veränderungen der Expression von Genen bewirken kann. Ein Fehlen der Kinase sollte dazu führen, dass der Response Regulator nicht mehr phosphoryliert wird und er somit die Transkription von ihm abhängiger Gene nicht mehr beeinflusst. Im Fall des Zwei-Komponenten Systems CiaRH wäre daher zu erwarten, dass die Inaktivierung von *ciaH* in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* dazu führt, dass CiaR nicht mehr phosphoryliert wird und ähnlich wie in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A die Aktivität der CiaR abhängigen Promotoren deutlich abnimmt. Abb. 4.42 zeigt jedoch, dass die Inaktivierung von *ciaH* praktisch keinen Einfluss auf die Expression der Promotoren des *cia*-Regulons hat.

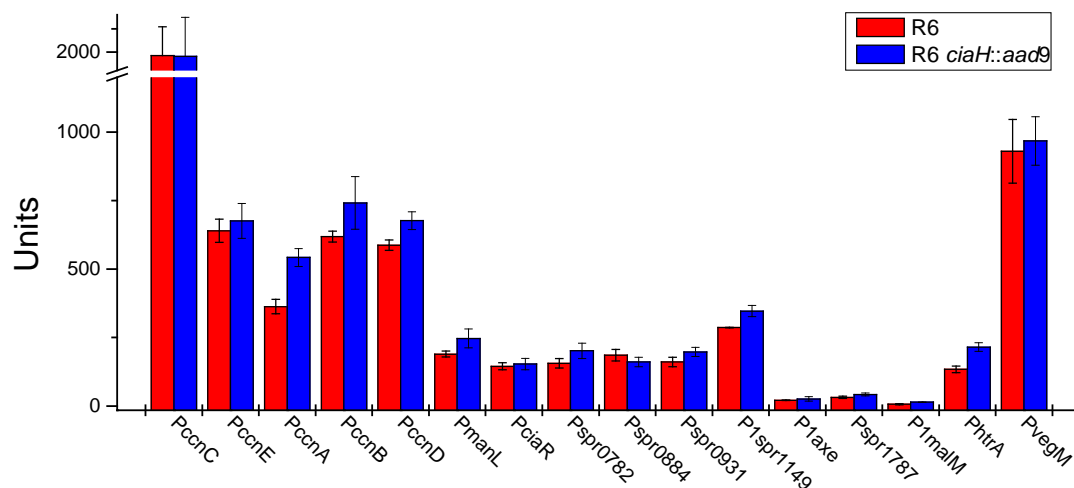


Abb. 4.42: Aktivität *cia*-regulierter Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in C-Medium sind rot für *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und blau für *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* dargestellt.

Statt der erwarteten Abnahme der Aktivität zeigen die meisten Promotoren sogar eine leichte Zunahme. Beispielsweise ist die Aktivität von P_{ccnA} in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* etwa 1,5fach, die von P_{htxA} sogar 1,6fach höher als im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 (Tab. 4.10). Jedoch bleiben die Veränderungen stets unterhalb eines Faktors von 2. Veränderungen in dieser Größenordnung könnten auch mit Veränderungen in verschiedenen Chargen des relativ komplexen C-Mediums zusammenhängen. Wie unter 4.10 gezeigt wird, lässt sich die hier beobachtete leicht erhöhte Transkription des *cia*-Regulons nicht reproduzieren. Es ist daher davon auszugehen, dass die Inaktivierung von *ciaH* in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* keinen Einfluss auf die Transkription der Gene des *cia*-Regulons hat. Da zuvor gezeigt wurde, dass für die Aktivität von CiaR *in vitro* eine Phosphorylierung aber unbedingt notwendig ist, müssen *in vivo* andere Faktoren als CiaH für die Phosphorylierung verantwortlich sein.

Tab. 4.10: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von *cia*-regulierten Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität in		<i>ciaH::aad9</i> / R6
	R6	<i>ciaH::aad9</i>	
<i>P_{ccnC}</i>	1960 \pm 310	1952 \pm 420	1
<i>P_{ccnE}</i>	640 \pm 42	676 \pm 64	1,06
<i>P_{ccnA}</i>	363 \pm 26	542 \pm 33	1,49
<i>P_{ccnB}</i>	619 \pm 20	741 \pm 96	1,20
<i>P_{ccnD}</i>	587 \pm 19	677 \pm 32	1,15
<i>P_{manL}</i>	190 \pm 11	247 \pm 35	1,30
<i>P_{ciaR}</i>	145 \pm 13	153 \pm 21	1,06
<i>P_{spr0782}</i>	156 \pm 17	202 \pm 28	1,29
<i>P_{ppmA}</i>	186 \pm 21	161 \pm 17	0,87
<i>P_{spr0931}</i>	161 \pm 17	198 \pm 17	1,23
<i>P_{1spr1149}</i>	287 \pm 1	347 \pm 20	1,21
<i>P_{1axe}</i>	21 \pm 1	26 \pm 8	1,24
<i>P_{spr1787}</i>	32 \pm 4	42 \pm 5	1,31
<i>P_{1malM}</i>	7 \pm 2	14 \pm 1	2
<i>P_{htrA}</i>	134 \pm 12	216 \pm 16	1,61
<i>P_{vegM}</i>	987 \pm 91	968 \pm 89	0,98

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

4.9.3 Einfluss von Acetylphosphat auf die Aktivität von CiaR

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Histidinkinase CiaH zumindest nicht alleine für die Phosphorylierung des Response Regulators CiaR verantwortlich sein kann. Da CiaR zur Bindung an seine Bindestelle und damit zur transkriptionellen Regulation ihm unterstellter Gene unbedingt phosphoryliert sein muss (s. 4.9.1), muss die Phosphorylierung auch auf anderem Wege erfolgen können. Bei einigen Response Regulatoren wurde beobachtet, dass sie *in vivo* durch den Phosphodonor Acetylphosphat phosphoryliert werden, vor allem wenn keine Phosphorylierung durch die Histidinkinase erfolgt (Laub und Goulian, 2007). Die Möglichkeit der Phosphorylierung von CiaR durch Acetylphosphat *in vitro* wurde bereits in den Bandshiftassays (s. 4.6 und 4.9) beobachtet.

Hier soll nun untersucht werden, welchen Einfluss das in der Zelle vorhandene Acetylphosphat auf die Aktivität CiaR abhängiger Promotoren hat. In *E. coli* wurde beobachtet, dass die Acetylphosphatkonzentration stark von der C-Quelle im Wachstumsmedium abhängig ist, und dass die höchsten Konzentrationen mit Pyruvat als C-Quelle erreicht werden (McCleary *et al.*, 1993). In einem ersten Versuch wurde daher getestet, wie sich die Expression von Genen des *cia*-Regulons verhält, wenn auf das im C-Medium zugegebene Pyruvat verzichtet wird. Der

Verzicht auf Pyruvat im Wachstumsmedium von *S. pneumoniae* R6 führte zwar zu einem leicht verlangsamten Wachstum, jedoch hatte er keinen Einfluss auf die Aktivität *cia*-regulierter Promotoren (Abb. 4.43; Tab. 4.11). Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass den Zellen das im Stoffwechsel produzierte Pyruvat, beispielsweise aus der Glykolyse, in vollem Umfang zur Verfügung stand.

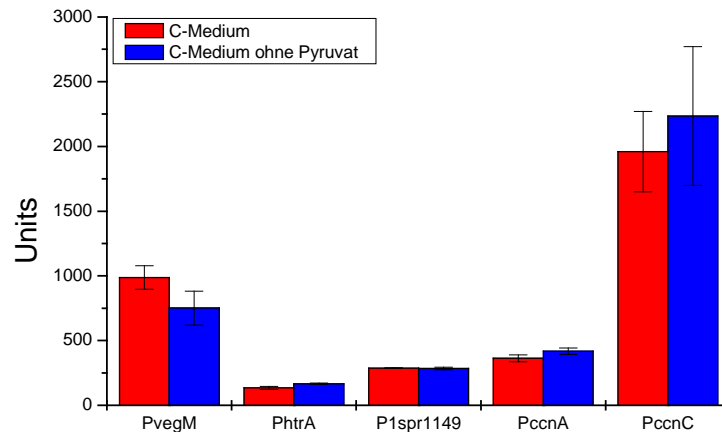


Abb. 4.43: Aktivität *cia*-regulierter Promotoren in C-Medium ohne Pyruvat. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in *S. pneumoniae* R6 sind rot für C-Medium und blau für C-Medium ohne Pyruvat dargestellt.

Tab. 4.11: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von *cia*-regulierten Promotoren in *S. pneumoniae* R6 in C-Medium ohne Pyruvat.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		C ohne Pyr. / C
	C-Medium	C-Medium ohne Pyruvat	
P_{vegM}	987 ± 91	751 ± 132	0,76
P_{htrA}	134 ± 12	167 ± 5	1,25
P_{Ispr1149}	287 ± 1	284 ± 10	0,99
P_{ccnA}	363 ± 26	418 ± 24	1,15
P_{ccnC}	1960 ± 310	2235 ± 536	1,14

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in *S. pneumoniae* R6 gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

Abb. 4.44 zeigt die Stoffwechselwege, welche in *S. pneumoniae* R6 zur Bildung von Acetylphosphat führen können (nach KEGG PATHWAY Database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Das Ausschalten des Gens für die Pyruvatoxidase SpxB, welche die Herstellung von Acetylphosphat aus Pyruvat katalysiert, führte in einer Arbeit mit *S. pneumoniae* D39 zu einem etwa 6fachen Abfall der Acetylphosphatkonzentration in der Zelle (Pericone *et al.*, 2003). SpxB scheint daher das Schlüsselenzym für die Acetylphosphatproduktion in *S. pneumoniae* zu sein.

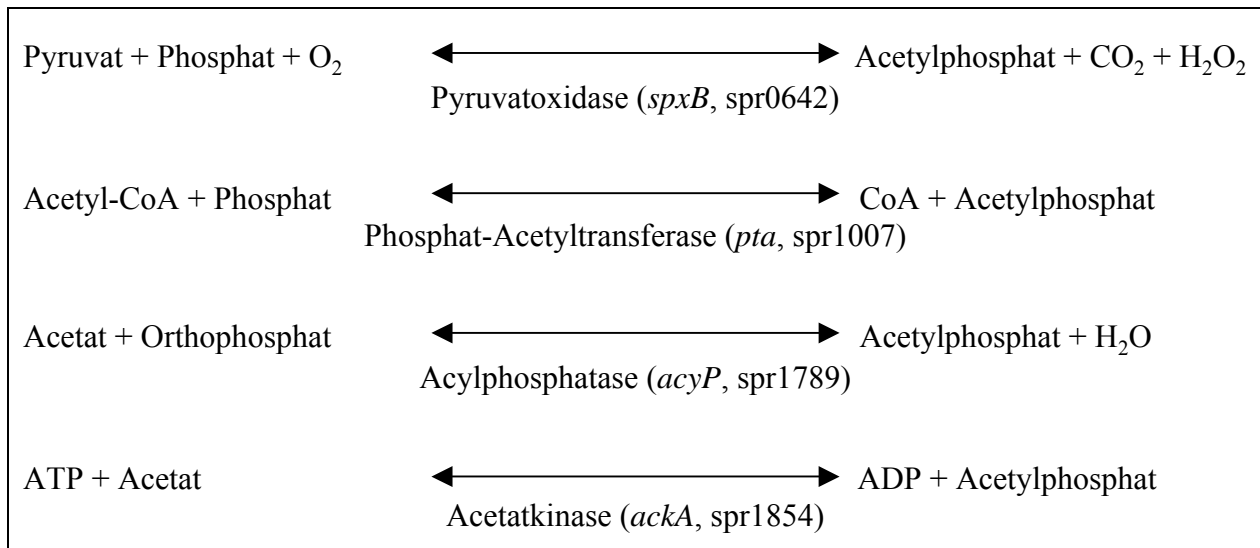


Abb. 4.44: Stoffwechselwege zur Bildung von Acetylphosphat in *S. pneumoniae* R6. Abgeleitet von KEGG PATHWAY Database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

Um den Einfluss der von SpxB katalysierten Reaktion auf die Expression der Gene des CiaRH Regulons zu überprüfen, wurde mittels einer Erythromycinresistenzkassette das Gen *spxB* ausgeschaltet (Bättig und Mühlemann, 2008). Sollte das Ausschalten von *spxB* tatsächlich zu einem Abfall der Acetylphosphatkonzentration in der Zelle führen und sollte CiaR dadurch in geringerem Maße phosphoryliert vorliegen, so wäre eine verminderte Aktivität der exemplarisch ausgewählten Promotoren P_{htrA}, P_{spr1149} und P_{ccnA} zu erwarten.

Jedoch ist dies nicht zu beobachten (Abb. 4.45). Die Aktivitäten von P_{spr1149} und dem Kontrollpromotor P_{vegM} bleiben praktisch völlig unbeeinflusst von der Inaktivierung von *spxB*, P_{htrA} und P_{ccnA} zeigen sogar eine leichte Zunahme ihrer Aktivität. Die Veränderungen fallen mit

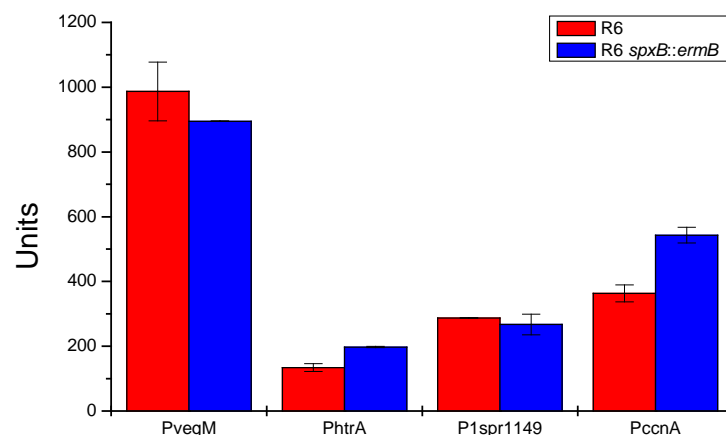


Abb. 4.45: Aktivität *cia*-regulierter Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB*. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in C-Medium sind rot für *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und blau für *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB* dargestellt.

einem Faktor von maximal 1,5 (Tab. 4.12) aber so gering aus, dass sie kaum als signifikant bewertet werden können. Ein Einfluss des über SpxB produzierten Acetylphosphats auf die Aktivität des *cia*-Regulons konnte somit nicht beobachtet werden. Möglicherweise könnten jedoch in *S. pneumoniae* R6 auch andere Faktoren als SpxB noch einen wesentlichen Einfluss auf den zellulären Acetylphosphatpool haben.

Tab. 4.12: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von *cia*-regulierten Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB*.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		<i>spxB::ermB</i> / R6
	R6	<i>spxB::ermB</i>	
P_{vegM}	987 \pm 91	895 \pm 1	0,91
P_{htrA}	134 \pm 12	197 \pm 2	1,47
$P_{I_{spr1149}}$	287 \pm 1	267 \pm 32	0,93
P_{ccnA}	363 \pm 26	543 \pm 24	1,5

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

4.9.4 Effekt der gleichzeitigen Inaktivierung der Gene *spxB* und *ciaH*

Von anderen Zwei-Komponenten Systemen ist bekannt, dass eine effiziente Phosphorylierung des Response Regulators durch Acetylphosphat vor allem dann stattfindet, wenn die Histidinkinase fehlt (Laub und Goulian, 2007). Ist die Histidinkinase vorhanden, so wird die durch Acetylphosphat verursachte Phosphorylierung des Response Regulators durch die Phosphataseaktivität der Histidinkinase vermutlich wieder aufgehoben. Unter natürlichen Bedingungen, d.h. bei Vorhandensein der Histidinkinase, hätte Acetylphosphat also effektiv keinen Einfluss auf die Phosphorylierung eines Response Regulators.

In den Abschnitten 4.9.2 und 4.9.3 wurde gezeigt, dass weder die Inaktivierung der Histidinkinase CiaH, noch die Inaktivierung von *spxB*, was vermutlich zu einem herabgesetzten Acetylphosphatniveau in der Zelle führt, einen Einfluss auf CiaR abhängige Promotoren hatten. Da dabei aber immer nur eines der Gene inaktiviert war, könnte die Phosphorylierung von CiaR auch über den jeweils noch vorhandenen Weg erfolgt sein. Deshalb wurden in einem Stamm sowohl *spxB* als auch *ciaH* in Kombination inaktiviert. Dieser Stamm (*S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ciaH::aad9*) zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 in C-Medium eine verlängerte Generationszeit von etwa 50 min (R6 etwa 30 min) und erreichte nur eine maximale Zelldichte von etwa Nephelo 110 (R6 mindestens Nephelo 125).

4. Ergebnisse

Die Analyse CiaR abhängiger Promotoren ließ aber auch in diesem Stamm keine starken Veränderung erkennen (Abb. 4.46; Tab. 4.13), wenn auch die Aktivität der untersuchten Promotoren P_{htrA} , $P_{I_{spr1149}}$ und P_{ccnA} im Vergleich zum Wildtypstamm herabgesetzt war. P_{ccnA} zeigte dabei mit einer 0,66fach geringeren Aktivität den größten Unterschied. Da in den Stämmen mit einzeln inaktivierten *spxB* bzw. *ciaH* Genen die Unterschiede noch geringer ausfielen bzw. sogar ein Anstieg der Promotoraktivitäten zu beobachten war, könnte die hier beobachtete Veränderung dennoch ein Hinweis darauf sein, dass CiaR sowohl durch CiaH als auch durch Acetylphosphat phosphoryliert werden kann. Die Inaktivierung weiterer Gene deren Produkte zur Herstellung von Acetylphosphat beitragen (s. Abb. 4.44), sowie die Bestimmung des Acetylphosphatniveaus in der Zelle, könnten dazu weitere Erkenntnisse liefern.

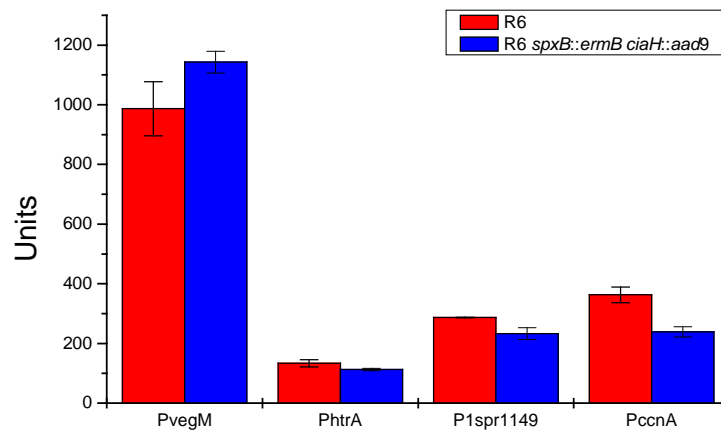


Abb. 4.46: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ciaH::aad9*. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Aktivitäten der Promotor-*lacZ* Fusionen in C-Medium sind rot für *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und blau für *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ciaH::aad9* dargestellt.

Tab. 4.13: β -Galaktosidaseaktivität ausgehend von CiaR abhängigen Promotoren in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ciaH::aad9*.

Promotor	β -Galaktosidaseaktivität		
	R6	<i>spxB::ermB ciaH::aad9</i>	<i>spxB::ermB</i> / R6
P_{vegM}	987 ± 91	1143 ± 36	1,16
P_{htrA}	134 ± 12	113 ± 4	0,84
$P_{I_{spr1149}}$	287 ± 1	233 ± 20	0,81
P_{ccnA}	363 ± 26	239 ± 217	0,66

β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Alle Assays wurden in C-Medium gegen Ende des exponentiellen Wachstums durchgeführt.

4.10 Veränderungen in der Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} während des Wachstums

Die Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in *S. pneumoniae* R6 wurde in den bislang in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten immer nur zu einem Zeitpunkt in der späten exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. In dieser Phase des Wachstums ging von den Promotoren des *cia*-Regulons im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 in C-Medium eine im β -Galaktosidaseassay deutlich messbare Expression aus (s. 4.4). Diese Experimente ließen jedoch nicht erkennen, ob sich die Aktivität dieser Promotoren im Laufe des Wachstums, beispielsweise bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, verändert. Vorangegangene Transkriptomstudien zeigten, dass sich die Expression *cia*-abhängiger Gene tatsächlich in Abhängigkeit der Wachstumsphase verändert (Heintz, 2006). Vor allem in der stationären Phase wurde eine verstärkte Transkription einiger Gene des *cia*-Regulons deutlich.

Daher wurde hier die Aktivität einiger exemplarisch ausgewählter Promotoren des CiaRH Regulons mittels β -Galaktosidaseassays zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums in C-Medium untersucht. Die erste Probe wurde bei einer Zelldichte von etwa $N=30$ genommen, die weiteren jeweils 30 min später, beziehungsweise nach Erreichen der stationären Wachstumsphase mit einem Abstand von 45 min. Abb. 4.47A zeigt, dass der Kontrollpromotor P_{vegM} zu keinem Zeitpunkt eine veränderte Aktivität erkennen lässt. Die CiaR abhängigen Promotoren P_{htrA} , P_{ccnA} , P_{ccnE} und $P_{I_{spr1149}}$ zeigten hingegen einen deutlichen Anstieg in der stationären Wachstumsphase. Die deutlichste Steigerung war bei P_{htrA} zu erkennen. Die Aktivität dieses Promotors in der stationären Phase lag um etwa das vierfache höher als während des exponentiellen Wachstums. Es ist in Abb. 4.47A deutlich zu erkennen, dass die Veränderung der Expression der Gene des *cia*-Regulons exakt mit dem Abknicken der Wachstumskurve in die stationäre Phase zusammenfällt.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das CiaRH Zwei-Komponenten System zu diesem Zeitpunkt ein zusätzliches Signal erhält, welches zu einer verstärkten Aktivität des Regulons führt. In 4.9.2 wurde zwar gezeigt, dass während des exponentiellen Wachstums die Inaktivierung des Kinasegens *ciaH* praktisch keinen Einfluss auf die Expression der Gene des *cia*-Regulons hat. Jedoch könnte das eventuell zu Beginn der stationären Phase auftauchende Signal für das *cia*-System von CiaH perzipiert werden. In diesem Fall müsste *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* ein anderes Verhalten zeigen als der Wildtypstamm. Die Promotoren, deren Aktivität in *S. pneumoniae* R6 in Abhängigkeit der Wachstumsphase untersucht wurden,

4. Ergebnisse

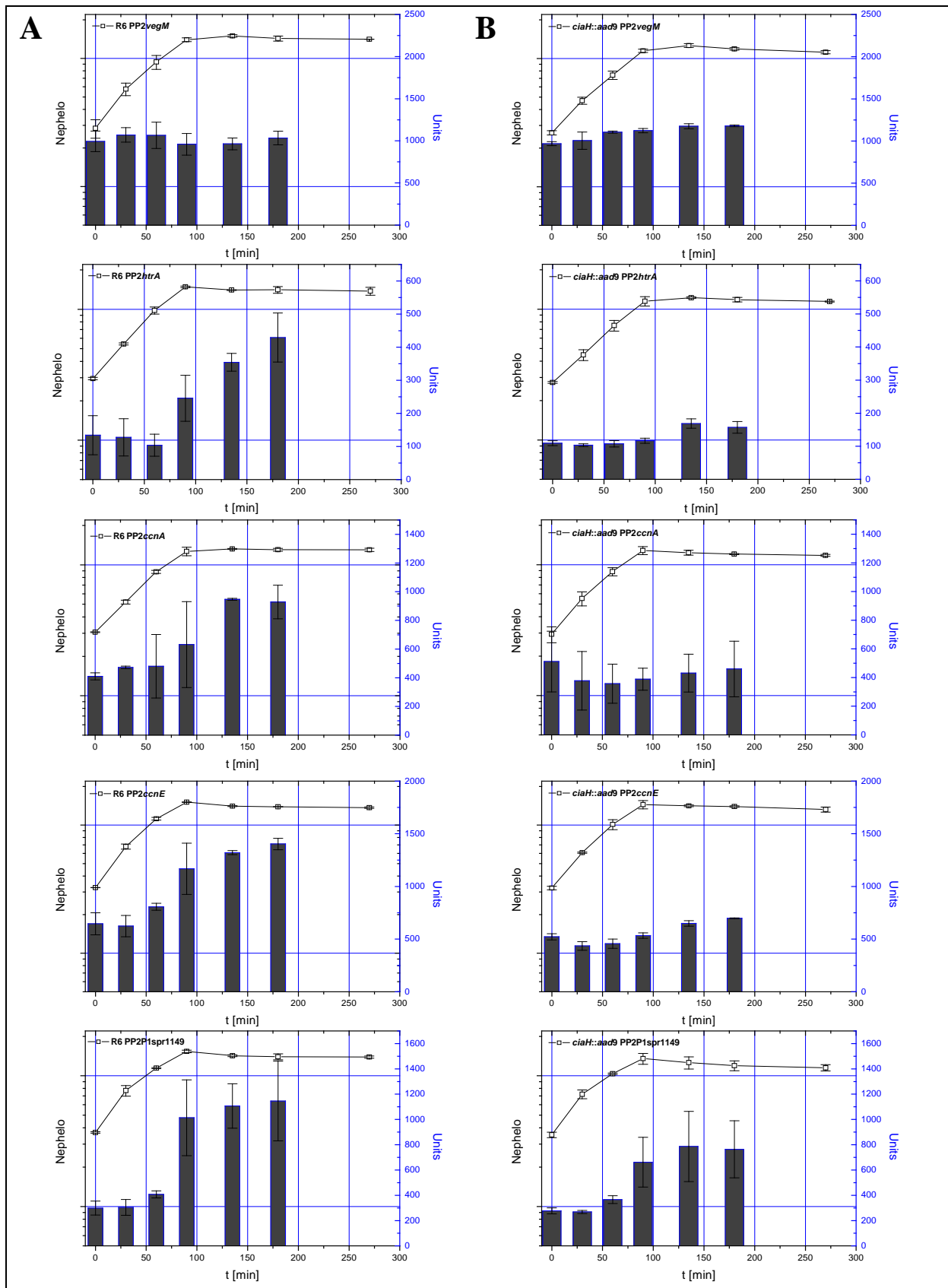


Abb. 4.47: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in Abhängigkeit der Wachstumsphase in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Als Wachstumsmedium wurde C-Medium verwendet.

wurden deshalb auch in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* analysiert. Im Vergleich zum Wildtypstamm ist in Abb. 4.47B zu sehen, dass der Anstieg der Aktivität von P_{htrA} , P_{ccnA} und P_{ccnE} zu Beginn der stationären Phase in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* nicht vorhanden ist. $P_{I_{spr1149}}$ stellt allerdings einen Sonderfall dar, da dieser hier als einziger der untersuchten Promotoren des *cia*-Regulons weiterhin einen Anstieg der Aktivität zeigt. Jedoch fällt dieser mit einem Faktor von etwa 2,5 etwas weniger stark aus als im Wildtypstamm mit einem Faktor von etwa 3,7. Außerdem gibt es Hinweise, dass dieser Promotor einer weiteren, von CiaRH unabhängigen Regulation unterliegt (Volz, 2008).

Für das *ciaH* Allel C306, welches für ein CiaH Protein mit einem Aminosäureaustausch (T230P) nahe des konservierten Histidinrestes codiert (Guenzi *et al.*, 1994), wurde in 4.4 gezeigt, dass es zu einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Aktivität der Promotoren des *cia*-Regulons führt. Um zu überprüfen, ob diese in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtete Aktivität das Maximum der Aktivierung CiaR abhängiger Promotoren darstellt oder ob wie im Wildtyp nochmals eine Zunahme der Aktivität erfolgt, wurde die Aktivität der Promotoren P_{htrA} und P_{ccnA} in *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} in Abhängigkeit der Wachstumsphase bestimmt. Abb. 4.48 zeigt, dass in *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} die Aktivität der beiden CiaR abhängigen Promotoren über die gesamte Wachstumskurve deutlich erhöht ist. Während des exponentiellen Wachstums entsprechen die Unterschiede von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} den in 4.4 beobachteten Unterschieden. Außerdem zeigt auch *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} den im Wildtyp beobachteten Anstieg der Aktivität der beiden Promotoren in der stationären Wachstumsphase. Die Aktivierung des *cia*-Systems durch den Aminosäureaustausch T230P in CiaH und die Aktivierung bei Eintritt in die stationäre Phase sind also unabhängig voneinander.

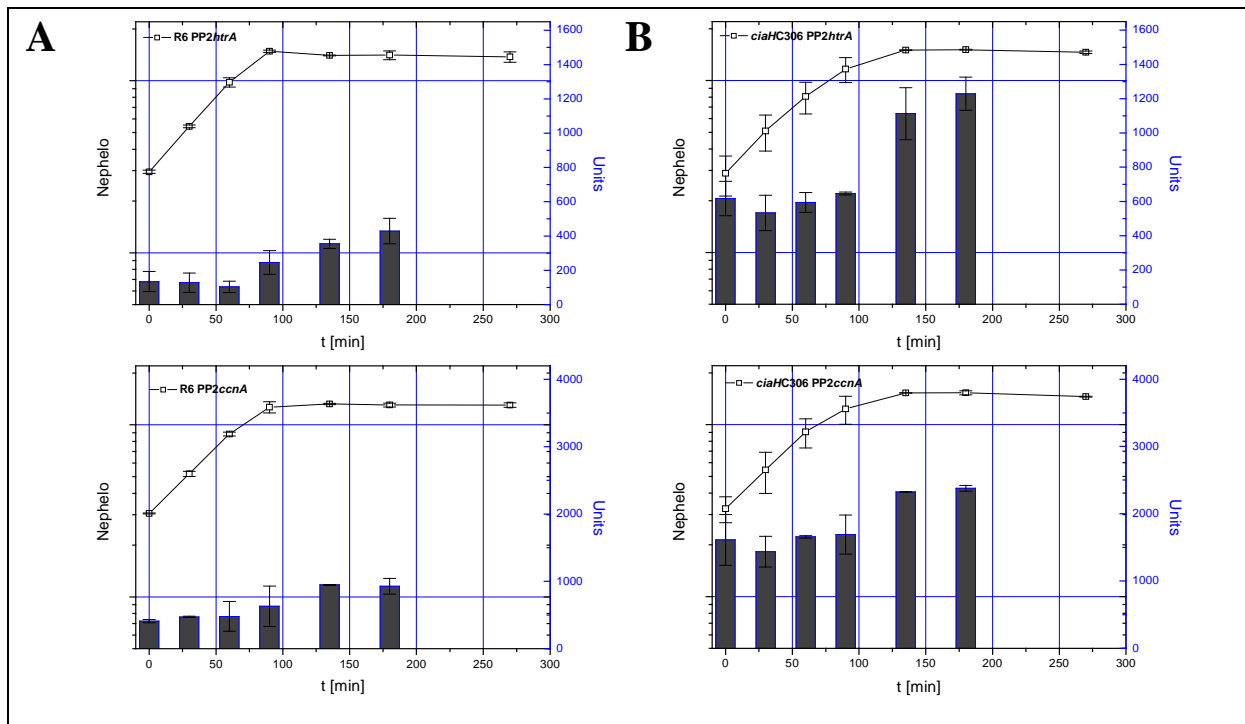


Abb. 4.48: Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in Abhängigkeit der Wachstumsphase in *S. pneumoniae* R6 Wildtyp und *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306}. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP / min / mg Protein. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Als Wachstumsmedium wurde C-Medium verwendet.

5 Diskussion

5.1 Die Promotoren des CiaRH Regulons

In mehreren Transkriptomstudien konnte eine große Menge von Genen identifiziert werden, die in Abhängigkeit des Zwei-Komponenten Systems CiaRH exprimiert werden (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006). Um die direkt durch CiaR regulierten Gene zu identifizieren, wurde außerdem ein genomweiter DNA-binde Assay (SPDB Assay) durchgeführt (Mascher, 2001). Dazu wurde chromosomale DNA von *S. pneumoniae* mit Restriktionsenzymen geschnitten, mit CiaR inkubiert, DNA-CiaR Komplexe isoliert und die gebundenen DNA-Fragmente identifiziert. Dabei wurden 18 CiaR-Zielfragmente identifiziert. Weitere Hinweise darauf, welche Gene direkt, d.h. durch Bindung des transkriptionellen Response Regulators CiaR in ihrem Promotorbereich, reguliert werden, lieferten einige Experimente mit transkriptionellen Reporterfusionen der Promotoren von *htrA*, *spr1149 (lic)* und *manL* (Halfmann, 2004).

In dieser Arbeit konnten nun durch die Kombination von *in vivo* und *in vitro* Experimenten die Bindestelle von CiaR und die von diesem Response Regulator regulierten Promotoren eindeutig identifiziert werden. Zunächst wurde *in silico* nach Promotoren mit potentieller CiaR Bindestelle gesucht. Die Analyse dieser Promotoren mittels β -Galaktosidaseassay in *S. pneumoniae* R6 und seinen beiden *cia*-Mutanten *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*cia*HC306} zeigte bereits, welche der Promotoren abhängig von CiaRH reguliert werden. Zum Nachweis der direkten Regulation durch CiaR wurden die im β -Galaktosidaseassay analysierten Promotorfragmente in Bandshiftassays eingesetzt. Die Promotoren, die eine CiaRH abhängige Regulation *in vivo* zeigten, ließen auch in diesen *in vitro* Experimenten die Bindung von CiaR erkennen. Um zu zeigen, dass eine in allen regulierten Promotoren vorkommende Direct Repeat Sequenz die Bindestelle von CiaR darstellt, wurden Mutationen eingeführt, welche zum Verlust der Bindung von CiaR und damit auch zum Verlust der *cia*-abhängigen Regulation dieser Promotoren führten. Auf diese Weise konnte die bisher unbekannte Bindestelle von CiaR eindeutig identifiziert werden. Sie besteht aus zwei Hexameren mit der Sequenz TTTAAG, welche durch 5 bp voneinander getrennt sind. Die CiaR abhängige Regulation konnte für 16 Promotoren mit dieser Bindestelle nachgewiesen werden. In 14 Fällen lag dabei die CiaR Bindestelle etwa 10 bp

stromaufwärts einer –10 Region. Lediglich die Promotoren von *manL* und *dltX* weisen eine andere Struktur auf.

Diese beiden Promotoren zeigen auch in ihrer von CiaR abhängigen Expression ein anderes Verhalten. P_{manL} ist der einzig negativ durch CiaR regulierte Promotor, wozu die Lage der Direct Repeats stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes als Bindestelle eines Repressors passt (Klier *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 2007). Bei P_{dltX} liegt die CiaR Bindestelle etwa 50 bp stromaufwärts der –10 Region und zudem, wie auch bei P_{manL} , auf dem Gegenstrang. Die beiden Promotoren zeigen die geringste Abhängigkeit von CiaR. Während alle anderen CiaR abhängigen Promotoren eine zumindest zweifache Veränderung ihrer Aktivität in einer der beiden *cia*-Mutanten *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} aufweisen, ist die Veränderung der Aktivität von P_{manL} und P_{dltX} maximal 1,5fach.

Doch auch innerhalb der Gruppe der 14 Promotoren, in denen die CiaR-Bindestelle etwa 10 bp stromaufwärts der –10 Region liegt, existieren große Unterschiede in der Abhängigkeit von CiaR. So bewirkt die Inaktivierung von *ciaR* in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* bei den Promotoren P_{ccnA-E} , $P_{spr0931}$, $P_{1_{spr1149}}$, $P_{1_{axe}}$, $P_{1_{malM}}$ und P_{htrA} einen fast kompletten Verlust ihrer Aktivität. P_{ccnA-E} , $P_{spr0931}$, $P_{1_{spr1149}}$, und P_{htrA} zeigen bei deletiertem *ciaR* einen 50 bis 1000fachen Aktivitätsverlust. Bei $P_{1_{axe}}$ und $P_{1_{malM}}$ ist dieser Abfall weniger ausgeprägt, da sie bereits im Wildtypstamm eine sehr geringe Aktivität besitzen. Deshalb sollten sie eher zur Gruppe der weniger stark durch CiaR aktivierten Promotoren gezählt werden. Zu dieser Gruppe gehören auch die Promotoren von *ciaR*, *spr0782*, *ppmA* und *spr1787*. Diese Promotoren besitzen auch in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* eine deutlich messbare Aktivität. Außerdem werden diese Promotorfragmente in den Bandshiftassays schlechter von CiaR gebunden als die der stark CiaR abhängigen Promotoren.

Eine genauere Betrachtung der CiaR Bindestellen kann die Einteilung der Promotoren in diese beiden Gruppen erklären. Während P_{ccnA-E} , $P_{spr0931}$, $P_{1_{spr1149}}$, und P_{htrA} maximal eine Abweichung in der CiaR Bindestelle besitzen, welche zudem immer das erste T eines TTTAAG Hexamers betrifft, besitzen die Promotoren der zweiten Gruppe zum Teil zwei Abweichungen in der Bindestelle und die Abweichungen befinden sich im AAG Teil des Direct Repeats. Die Bedeutung der Gs in der Bindestelle wurde auch in den Mutageneseexperimenten mit P_{ccnC} und $P_{1_{spr1149}}$ deutlich. Wurden die Gs durch As ersetzt, konnte CiaR nicht mehr binden und eine Aktivität der Promotoren war nicht mehr vorhanden, genauso wie bei Inaktivierung von *ciaR*.

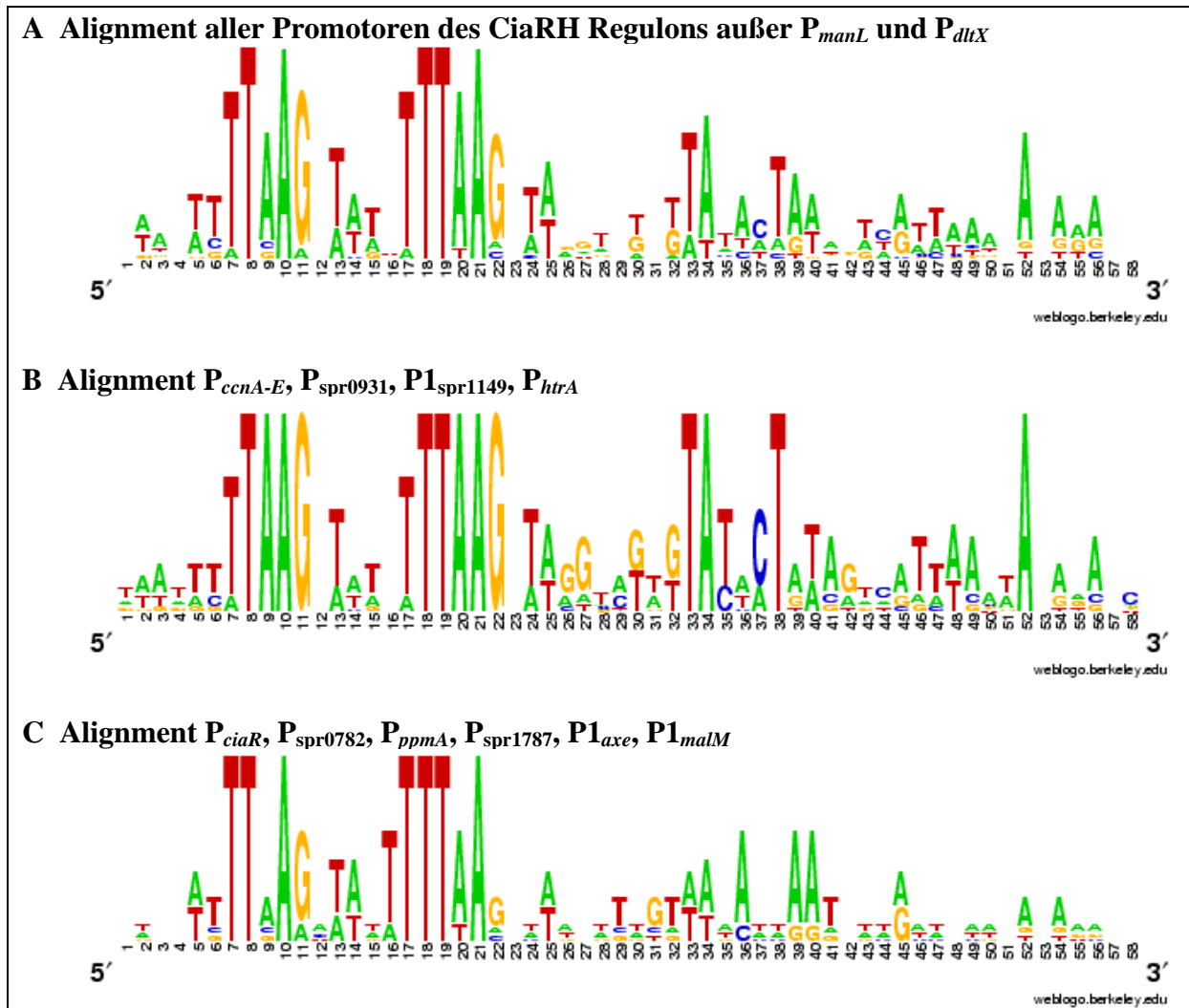


Abb. 5.1: Die Bindestelle von CiaR. Alignment CiaR abhängiger Promotoren mit WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). A: Alignment aller Promotoren des CiaRH Regulons außer P_{manL} und P_{dltX} . B: Alignment stark CiaR abhängiger Promotoren. C: Alignment von Promotoren mit geringer Aktivierung durch CiaR.

Die Analyse der CiaR Bindestellen der beiden Gruppen CiaR abhängiger Promotoren mit WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>), einem Programm, das die Konservierung der Basen in einem Alignment durch die Schriftgröße der einzelnen Basen in der Konsensussequenz darstellt, verdeutlicht die Unterschiede in der Konservierung einzelner Basen innerhalb der Bindestelle (Abb. 5.1). Die stark CiaR abhängigen Promotoren zeigen eine sehr große Übereinstimmung vor allem im AAG Teil der Bindestelle (Abb. 5.1 B). Sogar die -10 Region ist innerhalb dieser Promotoren gut konserviert, wobei diese erstaunlicherweise eher die Konsensussequenz TATACT statt TATAAT hat. Die weniger von CiaR abhängigen Promotoren lassen dagegen sehr viele Abweichungen von der Struktur TTTAAG-N₅-TTTAAG-N₁₀-TATAAT erkennen, so dass nur mit deren Sequenz die CiaR Bindestelle nur schwer eindeutig zu identifizieren wäre (Abb. 5.1 C).

Die Bindestelle von CiaR ist eine typische Bindestelle für Regulatoren der OmpR-Familie. An Direct Repeats binden beispielsweise auch die zur OmpR-Familie gehörenden Response Regulatoren OmpR aus *E. coli*, PhoP, ResD und YycF aus *Bacillus subtilis* (Martínez-Hackert und Stock, 1997; Liu und Hulett, 1997; Zhang und Hulett, 2000; Howell *et al.*, 2003). Die Bindestelle von PhoP in *E. coli* besteht beispielsweise, wie auch die Bindestelle von CiaR, aus zwei Hexanukleotid Repeats, welche durch 5 bp voneinander getrennt sind (Kato *et al.*, 1999). Allerdings variiert die Größe, der Abstand und die Lage der Repeats der Bindestellen innerhalb der OmpR Familie deutlich (Martínez-Hackert und Stock, 1997). Wie auch bei CiaR kann die Lage der Bindestelle eines Regulators in verschiedenen Promotoren eines Organismus unterschiedlich sein, woraus auch verschiedene regulatorische Effekte resultieren können. Der Response Regulator OmpR kann beispielsweise sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription wirken, je nachdem an welche Bindestelle er bindet (Slauch und Silhavy, 1989). Offensichtlich kann die CiaR Bindestelle auch einen Effekt auf die Aktivität eines Promotors haben, wenn sie eine andere als die beschriebene typische Lage 10 bp stromaufwärts einer -10 Region hat. P_{manL} und P_{dltX} verdeutlichen dies. Da im Genom von *S. pneumoniae* nur nach typischen CiaR abhängigen Promotoren gesucht wurde, ist es möglich, dass weitere Promotoren mit einer an untypischer Stelle liegenden CiaR Bindestelle vorkommen. Allerdings zeigen P_{manL} und P_{dltX} auch, dass der von CiaRH resultierende Einfluss in diesen Fällen relativ gering ist. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Transkriptomstudien (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006) ist deshalb davon auszugehen, dass alle für das CiaRH Regulon wesentlichen Promotoren in dieser Arbeit beschrieben wurden.

5.2 Die Gene des CiaRH Regulons

Von den 16 Promotoren des CiaRH Regulons geht die Transkription von 30 Genen aus, wobei 21 dieser Gene in sieben Operons organisiert sind (Abb. 4.35). Die CiaR Abhängigkeit der 30 Gene stimmt nicht mit der im vorigen Abschnitt beschriebenen Abhängigkeit der zugehörigen Promotoren überein. Vielmehr muss auch die Transkription berücksichtigt werden, welche von zusätzlichen *cia*-unabhängigen Promotoren vor *spr1149*, *axe* und *malM* ausgeht. Da diese Promotoren ($P2_{spr1149}$, $P2_{axe}$, $P2_{malM}$) eine ähnliche Stärke besitzen wie die entsprechenden CiaR abhängigen (s. Tab. 4.3), wird die Expression der Gene *spr1149*-*spr1145*, *axe* und *malMP* weitaus weniger von CiaRH beeinflusst, als es die Regulation an ihren CiaR abhängigen Promotoren vermuten ließe. Daher erscheint eine Einteilung der Gene nach ihrer CiaR Abhängigkeit, wie in Tab. 5.1 dargestellt, sinnvoll. Da ohne CiaR praktisch keine Expression von *ccnA-E*, *spr0931*, *htrA* und *parB* vorhanden ist, bilden diese acht Gene das Kernregulon von CiaRH in *S. pneumoniae* R6. Außerdem muss das 60 bp lange Gen *spr1538a*, welches von Hoskins *et al.* (2001) im Genom von *S. pneumoniae* R6 nicht annotiert wurde, zum Kernregulon gezählt werden, da der Promotor $P2_{axe}$ stromabwärts dieses Gens liegt (s. Abb. 4.21). Allerdings sollte für dieses Gen experimentell gezeigt werden, dass es tatsächlich für ein 20 bp langes Peptid codiert. Die Expression der anderen Gene des CiaRH Regulons wird dagegen durch Anwesenheit von CiaR nur um einen Faktor zwischen 1,2 (*dltXABCD*) und 5 (*ppmA*) verändert. Sie stellen daher das erweiterte Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH dar.

Im Folgenden wird genauer auf die Funktion der einzelnen Genprodukte eingegangen werden. Dabei wird offensichtlich, dass eine Vielzahl der Proteine des CiaRH Regulons an der Synthese von Bausteinen der Zellhülle beteiligt sind. Außerdem sind viele Proteine, wie in Abb. 5.2 dargestellt, Membranproteine oder sie werden sekretiert. Die Lokalisation der Proteine wurde mit Hilfe der Programme SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) und SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagt.

Bei der *in silico* Suche nach Bindestellen von CiaR im Genom von *S. pneumoniae* R6 wurden fünf Promotoren identifiziert, von welchen offensichtlich die Expression von kleinen, nicht-codierenden, regulatorischen RNAs ausgeht. Sie sind die bisher einzigen nicht-codierenden regulatorischen RNAs die in *Streptococcus pneumoniae* identifiziert wurden. In *S. pyogenes* wurden dagegen bereits einige wenige nicht translatierte regulatorische RNAs beschrieben

Tab. 5.1: Die Gene des CiaRH Regulons.

spr Nummer / Gen	Genprodukt	Länge (AS / nt)	Funktion Genprodukt	Lokalisation
Stark CiaR abhängige Gene				
ccnC ¹ (vor spr0022)	csRNA3	100/101	Nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnE ¹ (vor spr0219)	csRNA5	147/148/ 151	Nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnA ¹ (vor spr0238)	csRNA1	92/93	Nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnB ¹ (vor spr0238)	csRNA2	94/95/96	Nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnD ¹ (vor spr0240)	csRNA4	87/90/92/ 94/95	Nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
spr0931	Spr0931	324	Konserviertes hypothetisches Protein	extrazellulär
spr2045	HtrA	393	Serinprotease	extrazellulär
spr2046	ParB	252	Chromosomen Segregationsprotein	cytoplasmatisch
spr1538a ¹	Spr1538a	20	Hypothetisches Protein	cytoplasmatisch
Schwach CiaR abhängige Gene				
spr0707	CiaR	224	Response Regulator	cytoplasmatisch
spr0708	CiaH	444	Histidinkinase	Membran
spr0782	Spr0782	142	Konserviertes hypothetisches Protein	cytoplasmatisch
spr0884	PpmA	313	Peptidyl Prolyl Isomerase	extrazellulär
spr1149	Spr1149	235	Konserviertes hypothetisches Protein; Cholin Substitution von Teichonsäuren	cytoplasmatisch
spr1148	Spr1148	346	Konserviertes hypothetisches Protein; Cholin Substitution von Teichonsäuren	cytoplasmatisch
spr1147	LicA (Pck)	289	Cholinkinase	cytoplasmatisch
spr1146	LicB	296	Transportprotein	Membran
spr1145	LicC	229	CTP:Phosphocholin Cytidyltransferase	cytoplasmatisch
spr1538	Axe	326	Acetylerase	cytoplasmatisch
spr1787	Spr1787	227	Konserviertes hypothetisches Protein	Membran
spr1917	MalM	505	Amylomaltase	cytoplasmatisch
spr1916	MalP	752	Maltose Phosphorylase	cytoplasmatisch
spr1982a ¹	DltX	43	Konserviertes hypothetisches Protein	Membran
spr1982	DltA (Dcl)	516	D-Alanyl Carrier Protein Ligase	cytoplasmatisch
spr1981	DltB	414	Transportprotein	Membran
spr1980	DltC (Dcp)	79	D-Alanyl-Carrierprotein	cytoplasmatisch
spr1979	DltD	424	Beteiligt an Ligation Dcp-D-Alanin	Membran
Negativ von CiaR regulierte Gene				
spr0261	ManL	329	Mannose / Glucose Phosphotransferase System	Membran
spr0260	ManM	267		Membran
spr0259	ManN	303		cytoplasmatisch

¹Von Hoskins *et al.* (2001) nicht annotierte Gene.

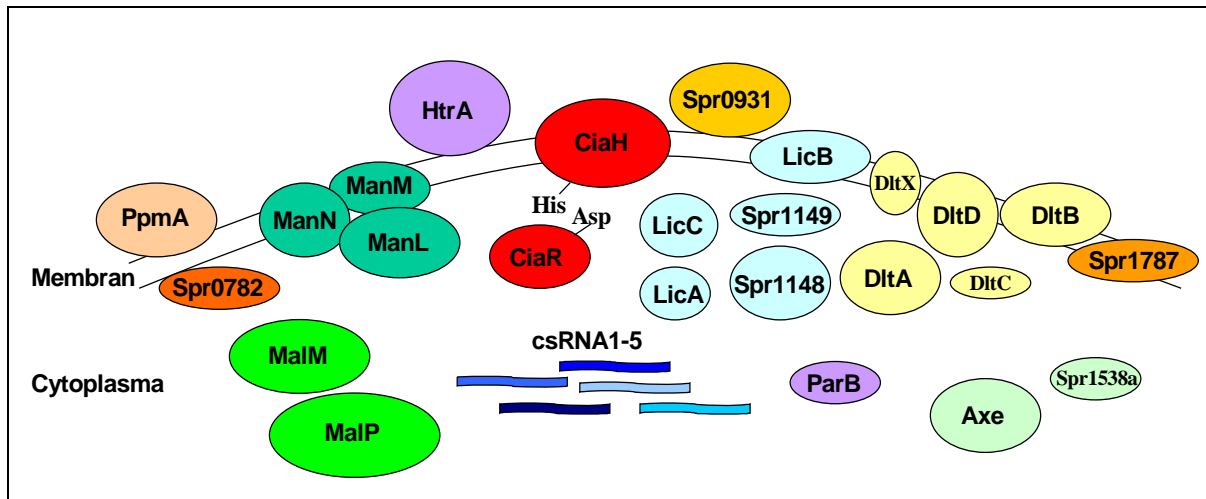


Abb. 5.2: Das Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH. Die Lage der Genprodukte des Regulons in der Zelle ist dargestellt. Die Produkte eines Operons sind farblich gleich markiert.

(Kreikemeyer *et al.*, 2001; Mangold *et al.*, 2004; Roberts und Scott, 2007). Auch in einer Vielzahl anderer Organismen wurde gezeigt, dass kleine, nicht-codierende RNAs an einer Vielzahl von posttranskriptionellen Regulationsprozessen beteiligt sein können (Gottesman, 2004; Majdalani *et al.*, 2005; Vogel und Wagner, 2007). Die Gene dieser RNAs wurden *ccnA-E* genannt, die Genprodukte *csRNA1-5*. *ccn* steht dabei für *c*ia *c*ontrolled *n*on-coding RNA, *csRNA* für *c*ia *c*ontrolled *s*mall RNA. Die CiaR abhängige Aktivität der Promotoren P_{ccnA-E} wurde in dieser Arbeit gezeigt, während von M. Kovács die Existenz von *csRNA1-5* mit Northern Blots und die CiaR unabhängige Expression der stromabwärts gelegenen Gene nachgewiesen wurde (Halfmann *et al.*, 2007b). Es wurde auch gezeigt, dass *csRNA4* und *csRNA5* mit verantwortlich sind für den Lysephänotyp von *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*. Außerdem wurde inzwischen gezeigt, dass *csRNA1-5* an der Regulation der Kompetenz durch Interaktion mit dem Transkript von *comC* beteiligt sind (M. Kovács, persönliche Mitteilung). Nach weiteren Zielgenen von *csRNA1-5* und dem Zusammenhang mit den von CiaRH abhängigen Phänotypen wird momentan gesucht.

Das bisher wohl am intensivsten untersuchte Gen des CiaRH Regulons ist *htrA*, welches für eine Serinprotease codiert. Die Lokalisation von HtrA an der Zelloberfläche, sowie seine Proteaseaktivität wurden experimentell bewiesen (Sebert *et al.*, 2005). Eine wesentliche Funktion dieses Gens in der Virulenz konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a, b). Außerdem geht von *htrA* auch ein wesentlicher Einfluss auf die genetische Kompetenz aus (Ibrahim *et al.*, 2004a; Sebert *et al.*, 2005; Schäfer, 2007). Allerdings widersprechen sich die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten

teilweise. Während Ibrahim *et al.* (2004a) in einer *htrA* Deletionsmutante eine Abnahme der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* beobachteten, zeigten Sebert *et al.* (2005), dass die Deletion von *htrA* im Wildtyp zwar keinen Einfluss auf die Kompetenz in THB Medium hat, in einem Stamm mit *ciaH*^{C306} Allel jedoch die Kompetenz in C-Medium erhöht. In den beiden Arbeiten wurden unterschiedliche Deletionskonstrukte von *htrA* verwendet, welche unterschiedliche polare Effekte auf das stromabwärts von *htrA* gelegene Gen *parB*, für welches in *S. mutans* ein Einfluss auf die Transformierbarkeit nachgewiesen wurde (Ahn *et al.*, 2005), haben könnten. Stromaufwärts von *htrA* befinden sich mehrere DnaA Boxen (Gasc *et al.*, 1998) sowie in einer Entfernung von etwa 900 bp das *comCDE* Operon. Sollte durch die verschiedenen Deletionskonstrukte die DNA-Struktur dieser Region des Chromosoms verändert werden, so könnte dies auch einen Einfluss auf die Expression von *comCDE* und damit auf die Kompetenz haben. Um diese Frage zu klären, wurden in einer weiteren Arbeit (Schäfer, 2007) weitere Deletionskonstrukte von *htrA* hergestellt, unter anderem ein Minigen ohne Resistenzkassette. Für dieses wurde gezeigt, dass es die Expression von *parB* nicht beeinflusst. Diese Deletion von *htrA* führte zur Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* R6 in THB Medium, in welchem der Wildtypstamm nicht transformierbar ist. Daher scheint HtrA tatsächlich, wie auch von Sebert *et al.* (2005) beschrieben, einen negativen Einfluss auf die Kompetenz auszuüben. Momentan werden weitere Experimente durchgeführt, um diese Frage zweifelsfrei zu klären.

Das Gen *parB*, oft auch als *spo0J* bezeichnet, wird in *S. pneumoniae* R6 in einem Operon mit *htrA* transkribiert (Merai, 2003). Proteine der ParB Familie helfen bei der korrekten Aufteilung von Plasmiden und Chromosomen auf die Tochterzellen bei der Zellteilung (Leonard *et al.*, 2005). ParB bindet dabei an als *parS* bezeichnete Bindestellen, welche meistens, aber nicht ausschließlich, nahe des Replikationsursprungs zu finden sind (Livny *et al.*, 2007). Eine Bindung von ParB beeinflusst dabei normalerweise nicht die Genexpression (Breier und Grossman, 2007). Eine Deletion von *parB* bewirkt in *B. subtilis* das vermehrte Entstehen von Tochterzellen ohne DNA (Ireton *et al.*, 1994). In *S. mutans* spielt *parB*, wie bereits erwähnt, auch eine Rolle bei der Kompetenz (Ahn *et al.*, 2005). Daher muss auch für *S. pneumoniae* überprüft werden, ob über *parB* ein Teil des vom Zwei-Komponenten System CiaRH ausgehenden Kompetenzphänotyps vermittelt wird.

Die bisher beschriebenen Gene gehören alle zum Kernregulon von CiaRH. Von den beiden übrigen Gene dieser Gruppe, spr1538a und spr0931, ist nichts über ihre Funktion bekannt.

Das nur 20 Aminosäuren lange Peptid Spr1538a wurde in der Annotation von *S. pneumoniae* R6 nicht berücksichtigt (Hoskins *et al.*, 2001). Die Vorhersage, ob Peptide von dieser Größe tatsächlich exprimiert werden und eine Annotation daher sinnvoll ist, ist bekanntermaßen problematisch. Daher werden Ansätze entwickelt, dieses Problem durch bioinformatische Vorhersagen zu lösen (Ibrahim *et al.*, 2007). Spr0931 besitzt ein Signalpeptid und ist daher voraussichtlich an der Zelloberfläche lokalisiert.

Auch von den schwach CiaR abhängigen Genen spr0782 und spr1787 ist nichts über ihre Funktion bekannt. Spr0782 ist vermutlich ein lösliches Protein, wohingegen das Membranprotein Spr1787 sieben Transmembrandomänen besitzt.

Das Genprodukt von *axe* weist Homologie zu Acetylerasen auf. Häufig wurde Axe auch als Acetyl Xylan Esterase bezeichnet (Hoskins *et al.*, 2001). Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, dass *S. pneumoniae* ein Enzym zum Abbau des in pflanzlichen Zellwänden vorkommenden Xylans benötigt. Vielmehr wurde für Enzyme dieser Familie eine Aktivität mit einer Vielzahl von Substraten beobachtet (Degrassi *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2006). Unter anderem stellt auch Cephalosporin C ein Substrat für solche Esterasen dar. Da auch Cefotaxim ein Cephalosporin ist, liegt die Vermutung nahe, dass Axe an der durch eine Punktmutation in *ciaH* vermittelten Cefotaximresistenz der Mutante *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306} mit aktiverem *cia*-System beteiligt ist, vor allem, da P1_{axe} in dieser Mutante eine 7fach höhere Aktivität aufweist als im Wildtyp. Von Mascher (2001) durchgeführte Experimente deuten auch auf eine Beteiligung von Axe an der Cefotaximresistenz hin. Daher sollte die von Schäfer (2007) konstruierte *axe* Deletionsmutante detailliert auf ihr Resistenzverhalten hin untersucht werden. *axe* zeigte des weiteren eine verstärkte Transkription unter Säurestress (Martín-Galiano *et al.*, 2005).

Fundiertere Informationen existieren über die Funktion des *lic1* Operons (Kharat und Tomasz, 2006), dessen Gene spr1149, spr1148, *licA*, *licB* und *licC* für die Substitution der Teichonsäuren mit Cholin, einem für das Wachstum von *S. pneumoniae* essentiellen Molekül, wesentlich sind. Von den Genprodukten Spr1149 und Spr1148 existieren keine Informationen über die genaue Funktion. LicA ist eine Cholinkinase, LicB ein Cholin Transportprotein und LicC eine CTP:Phosphocholin Cytidyltransferase (Zhang *et al.*, 1999).

Die Gene des *lic1* Operons sind in *S. pneumoniae* R6 essentiell. Die Erklärung für dieses Phänomen lieferten zwei Arbeiten, in denen Mutanten isoliert wurden, welche Cholin-freie Teichonsäuren besitzen (Kharat und Tomasz, 2006; Damjanovic *et al.*, 2007). In einem von

Damjanovic *et al.* (2007) entwickelten Modell transportiert die Flippase TacF, codiert von dem Gen *spr1150*, in *S. pneumoniae* R6 ausschließlich Cholin-substituierte Teichonsäuren durch die Zellmembran. Eine Punktmutation in *spr1150* bewirkt jedoch, dass auch die Inaktivierung von *licA* möglich wird. In diesem Stamm konnte *S. pneumoniae* auch Cholin-unabhängig wachsen, da TacF nun auch Cholin-freie Teichonsäuren transportieren kann.

Die von Kharat und Tomasz (2006) und Damjanovic *et al.* (2007) isolierten Mutanten mit Cholin-freien Teichonsäuren zeigten eine deutlich verminderte Virulenz. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass in *S. pneumoniae* 10 (in R6) bzw. 15 (in TIGR4) Cholin-bindende Proteine existieren (Bergmann und Hammerschmidt, 2006), welche durch nicht-kovalente Bindung an die Cholinreste der Teichonsäuren an die Zellwand gebunden sind. Ohne Cholin fehlen diese Proteine, zu denen auch Virulenzfaktoren wie LytA, CbpA und CbpD gehören, in der Zellwand (López und García, 2004).

Das *lic1* Operon wird ausgehend von den beiden Promotoren $P1_{spr1149}$ und $P2_{spr1149}$ transkribiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass $P1_{spr1149}$ indirekt auch von dem Zwei-Komponenten System TCS11 reguliert wird (Volz, 2008). Jedoch ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, vor allem CiaR absolut notwendig für die von $P1_{spr1149}$ ausgehende Transkription. Der weitere, bisher unbekannte Regulator ist für die Aktivierung von $P1_{spr1149}$ offenbar verzichtbar. Die gleichzeitige Bindung von zwei Response Regulatoren an einem Promotor wurde auch für ComE und BlpR in *S. pneumoniae* (Knutsen *et al.*, 2004) und für mehrere Regulatoren in anderen Organismen beschrieben (Kenney, 2002; Smits *et al.*, 2007). Wie bereits dargestellt wurde, ist das *lic1* Operon in *S. pneumoniae* essentiell. Dennoch besteht die Möglichkeit der Inaktivierung von *ciaR* in *S. pneumoniae* trotz der CiaR Abhängigkeit von $P1_{spr1149}$, da die von $P2_{spr1149}$ ausgehende Transkription ausreichend ist. Die Existenz dieses Promotors wurde bereits bei einer translationellen Reporterfusion deutlich (Halfmann, 2004). Obwohl schon beobachtet wurde, dass eine transkriptionelle Reporterfusion von $P1_{spr1149}$ in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* keinerlei Aktivität zeigte, war in der translationellen Reporterfusion, welche die Region stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes von $P1_{spr1149}$ bis zu den ersten Codons von *spr1149* beinhaltete, eine deutliche Aktivität bei inaktiviertem *ciaR* messbar. Dies konnte nur auf die Existenz eines zweiten Promotors zurückgeführt werden. Dessen Unabhängigkeit von CiaR wurde auch darin deutlich, dass sowohl die transkriptionelle als auch die translationelle Reporterfusionen im Wildtyp und in *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} einen Anstieg in der stationären Wachstumsphase zeigten, die translationelle Fusion in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* hingegen nicht.

Ein weiteres von CiaRH reguliertes Operon, das an der Modifikation der Teichonsäuren von *S. pneumoniae* beteiligt ist, ist *dltXABCD*. Die Produkte dieses Operons bewirken die Substitution der Teichonsäuren mit D-Alanin. Bei DltX handelt es sich um ein nur 43 Aminosäuren langes Peptid mit unbekannter Funktion, welches erst kürzlich in *Staphylococcus aureus* beschrieben wurde (Koprivnjak *et al.*, 2006). Mit translationellen *lacZ* Reporterfusionen wurde gezeigt, dass *dltX* in *S. pneumoniae* R6 tatsächlich translatiert wird (Sandra Magin, Forschungspraktikum, Abteilung Mikrobiologie, TU Kaiserslautern). Die Substitution der Teichonsäuren mit D-Alanin findet statt, indem zunächst D-Alanin durch die D-Alanyl Carrier Protein Ligase DltA (Dcl) mit ATP aktiviert und im nächsten Schritt mit Hilfe von DltD an DltC (Dcp) ligiert wird. Mit DltB wird dann der D-Alanyl-Dcp Komplex durch die Zellmembran transportiert und in die Teichonsäuren eingebaut. In *S. pneumoniae* R6 werden die Gene aufgrund einer Punktmutation in *dltA* nicht exprimiert (Kovács *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu anderen Pneumokokken besitzt der Stamm R6 daher kein D-Alanin in der Zellwand (Draing *et al.*, 2006; Kovács *et al.*, 2006), was ihn sensibler gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden macht (Kovács *et al.*, 2006). Außerdem reduziert die Inaktivierung des *dlt* Operons die Virulenz von *S. pneumoniae* (Wartha *et al.*, 2007).

PpmA ist eines von 42 Lipoproteinen in *S. pneumoniae* R6 (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Diese Proteine zeichnen sich durch eine Cystein-haltige „Lipobox“ in einem Signalpeptid aus (Sutcliffe und Harrington, 2002). PpmA befindet sich an der Zelloberfläche und weist Homologie zu Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen auf, welche bei der Proteinfaltung von Bedeutung sind (Overweg *et al.*, 2000; Hermans *et al.*, 2006; Khandavilli *et al.*, 2008). In der Arbeit von Hermans *et al.* (2006) konnte diese Funktion allerdings nicht experimentell bestätigt werden. Jedoch ist ein Beitrag von PpmA zur Virulenz von *S. pneumoniae* beobachtet worden (Overweg *et al.*, 2000).

Die Gene des *manLMN* Operons codieren für ein Phosphotransferase System (PTS) der Mannose Klasse, PTS^{Man} (Lortie *et al.*, 2000). *manL* codiert dabei für das IIAB Protein, *manM* für IIC und *manN* für IID. In *Lactobacillus casei* beispielsweise, aber auch in anderen Milchsäurebakterien, wird Glucose hauptsächlich über PTS^{Man} transportiert. PTS^{Man} könnte auch im Zusammenhang mit der Virulenz von *S. pneumoniae* stehen. In *S. mutans* wurde dies bereits gezeigt (Abranches *et al.*, 2003). In diesem Organismus wurde auch beschrieben, dass PTS^{Man} einen Einfluss auf die Kompetenz und die Biofilmbildung hat und eine zentrale Rolle

in der Katabolitrepression (CCR; „carbon catabolite repression“) und damit eine Schlüsselrolle im Energiemetabolismus spielt (Abranches *et al.*, 2003; Abranches *et al.*, 2006). Die Membrankomponenten IIC und IID des PTS stellen außerdem Rezeptoren für Klasse II Bacteriocine dar (Erni, 2006; Diep *et al.*, 2007). Da auch in der Kompetenz Bacteriocine dieser Klasse, CibA und CibB, involviert sind (Claverys und Håvarstein, 2007), könnte auch über PTS^{Man} ein Zusammenhang zur Kompetenz bestehen.

Weitere an der Verwertung von Zuckern beteiligte Gene, die von CiaRH reguliert werden, sind *malM* und *malP*. Die zur Maltose- und Maltodextrinverwertung notwendigen Enzyme MalM und MalP sind eine Amylomaltase bzw. eine Maltose Phosphorylase. Der Promotor vor *malMP*, in dieser Arbeit mit P2_{malM} bezeichnet, wird in Abwesenheit von Maltose durch den transkriptionellen Regulator MalR, der zur LacI-GalR Familie gehört, fast vollständig reprimiert (Nieto *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 2001). In C-Medium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle steigt die Expression dieses Promotors im β -Galaktosidaseassay aber um etwa das 20fache im Vergleich zu C-Medium mit Glukose und Saccharose von etwa 5 Units auf etwa 105 Units an (Anette Schedler, Forschungspraktikum, Abteilung Mikrobiologie, TU Kaiserslautern). Die Aktivität des in dieser Arbeit mit P1_{malM} bezeichneten CiaR abhängigen Promotors wurde schon früher beobachtet, ohne jedoch den Promotor genau identifizieren zu können (Chen und Morrison, 1988; Nieto *et al.*, 2001). Die Rolle dieses Promotors bleibt rätselhaft, da er nur eine schwache Aktivität besitzt und daher offensichtlich keinen großen Einfluss auf die Expression von *malMP* ausübt, insbesondere wenn die Expression von P2_{malM} durch Maltose induziert wird. Da zwischen dem Transkriptionsstartpunkt von P1_{malM} und dem Startcodon von *malM* eine sehr lange Leadersequenz von 395 nt liegt, lag die Vermutung nahe, dass in dieser Region, ähnlich wie bei *dlt*, das Gen eines kleinen Peptids oder einer kleinen nicht codierenden RNA zu finden ist. Jedoch lieferte weder die Suche nach einem kurzen, für ein Protein codierenden Gen, noch die zur Identifizierung einer eventuell vorhandenen kleinen RNA durchgeführten Northern Blots ein Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich zum Zusammenhang der Phänotypen des CiaRH Zwei-Komponenten Systems mit den von ihm regulierten Genen sagen, dass eine ganze Reihe von Genen des CiaRH Regulons einen Einfluss auf die Virulenz von *S. pneumoniae* ausüben, teils direkt, wie *ppmA* und *htrA*, teils indirekt, wie das *lic1* und das *dlt* Operon. Der Lysephänotyp geht zum Teil auf *ccnDE* zurück, die Cefotaximresistenz in *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306} könnte mit *axe* zusammenhängen. Eine eindeutige Verbindung zur Kompetenz von *S. pneumoniae*

besteht über *htrA*. Allerdings muss der genaue Zusammenhang, auch unter Einbeziehung der Rolle von ParB, genauer untersucht werden, ebenso wie die Verbindung von *ccnA-E* zur Kompetenz. Eine abschließende Aussage zum Zusammenhang zwischen CiaRH und der Kompetenz wird jedoch schwierig sein, da die Kompetenz ein hoch regulierter Prozess ist, der von einer Vielzahl von verschiedensten Faktoren beeinflusst wird. Des Weiteren ist die Rolle vieler Gene des CiaRH Regulons noch vollkommen unklar. Eventuell könnten auch einige der bisher wenig untersuchten Gene, wie *spr0782*, *spr0931* oder *spr1787*, einen gewissen, wenn auch nicht entscheidenden, Beitrag zu den von CiaRH vermittelten Phänotypen liefern. Wie insbesondere für *htrA* erläutert wurde, ist aber besonders der Kompetenzphänotyp offensichtlich von vielen schwer vorhersehbaren Einflüssen abhängig und damit teils schwierig erfassbar. Dies erschwert die Identifizierung des genauen Zusammenhangs von CiaRH mit diesem von ihm vermittelten Phänotyp. Ebenso stellt sich aber auch das Erfassen der anderen CiaRH vermittelten Phänotypen Lyse und Resistenz gegen Cefotaxim schwierig dar. Vor allem die Lyse ist dabei sehr empfindlich, beispielsweise gegenüber minimalen Schwankungen in der Zusammensetzung des Wachstumsmediums. Die phänotypische Untersuchung des Zwei-Komponenten Systems CiaRH stellt daher stets eine besondere Herausforderung dar.

5.3 Das CiaRH Regulon in der Gattung *Streptococcus*

Außer in *S. pneumoniae* sind die Gene des Zwei-Komponenten Systems CiaRH auch in allen im Februar 2008 verfügbaren, vollständig sequenzierten Genomen der Gattung *Streptococcus* vorhanden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>). Zur Verfügung standen die Genomsequenzen von *S. sanguinis* SK36 (Xu *et al.*, 2007), *S. mutans* UA159 (Ajdić *et al.*, 2002), *S. pyogenes* MGAS315 (Beres *et al.*, 2002), *S. agalactiae* NEM316 (Glaser *et al.*, 2002), *S. thermophilus* CNRZ1066 (Bolotin *et al.*, 2004), *S. suis* 05ZYH33 (Chen *et al.*, 2007) und *S. gordonii* str. Challis substr. CH1 (Vickerman *et al.*, 2007). Außerdem waren die Genomsequenzen von *S. mitis* B6 (Regine Hakenbeck, unveröffentlicht) und *S. oralis* Uo5 (Regine Hakenbeck, unveröffentlicht) verfügbar. Die Sequenz von *S. oralis* Uo5 weist allerdings aufgrund der zur Sequenzierung des Genoms verwendeten 454 Sequenziermethode noch eine relativ große Zahl von Sequenzfehlern auf (Wicker *et al.*, 2006). In anderen Gattungen existiert CiaRH nicht (Jordan *et al.*, 2008). Aber auch innerhalb der Streptokokken sind die Proteine CiaR und vor allem CiaH nicht identisch (Abb. 5.3).

Vor allem die Histidinkinase CiaH zeigt eine recht große Variabilität. CiaH besitzt eine Identität zwischen 96% in *S. mitis* B6 und nur 48% in *S. suis* 05ZYH33 zu CiaH von *S. pneumoniae* R6. Auffällig ist, dass eine höhere Homologie erst ab Aminosäure 220 in CiaH von *S. pneumoniae* R6 vorhanden ist. In diesem Bereich beginnt die Kinasedomäne der Histidinkinase. Der davor liegende Bereich der Sensordomäne zeigt dagegen eine sehr große Varianz, was vermuten lässt, dass die verschiedenen Streptokokken mit CiaH unterschiedliche Signale perzipieren könnten.

Die CiaR Proteine sind zwischen 99% in *S. mitis* B6 und 84% in *S. pyogenes* MGAS315 identisch zu CiaR in *S. pneumoniae* R6. Die Erkennungshelix α_3 und die „wings“ W1 und W2, welche alle drei für die korrekte Interaktion mit der DNA verantwortlich sind (Martínez-Hackert und Stock, 1997), sind zu 100% identisch in allen untersuchten Streptokokken. Abweichungen in der Aminosäuresequenz befinden sich vielmehr hauptsächlich in den N- und C-terminalen β -Faltblattstrukturen β_1 -4 und β_6 -7 der DNA-bindenden Domäne von CiaR. Diese Bereiche sind zwar für die korrekte Faltung des Proteins wichtig, scheinen aber nur einen geringeren Einfluss auf die Spezifität der DNA-Bindung zu haben. Daher kann man annehmen, dass die Bindestelle von CiaR in allen Streptokokken sehr ähnlich zu der in *S. pneumoniae* R6 sein muss.

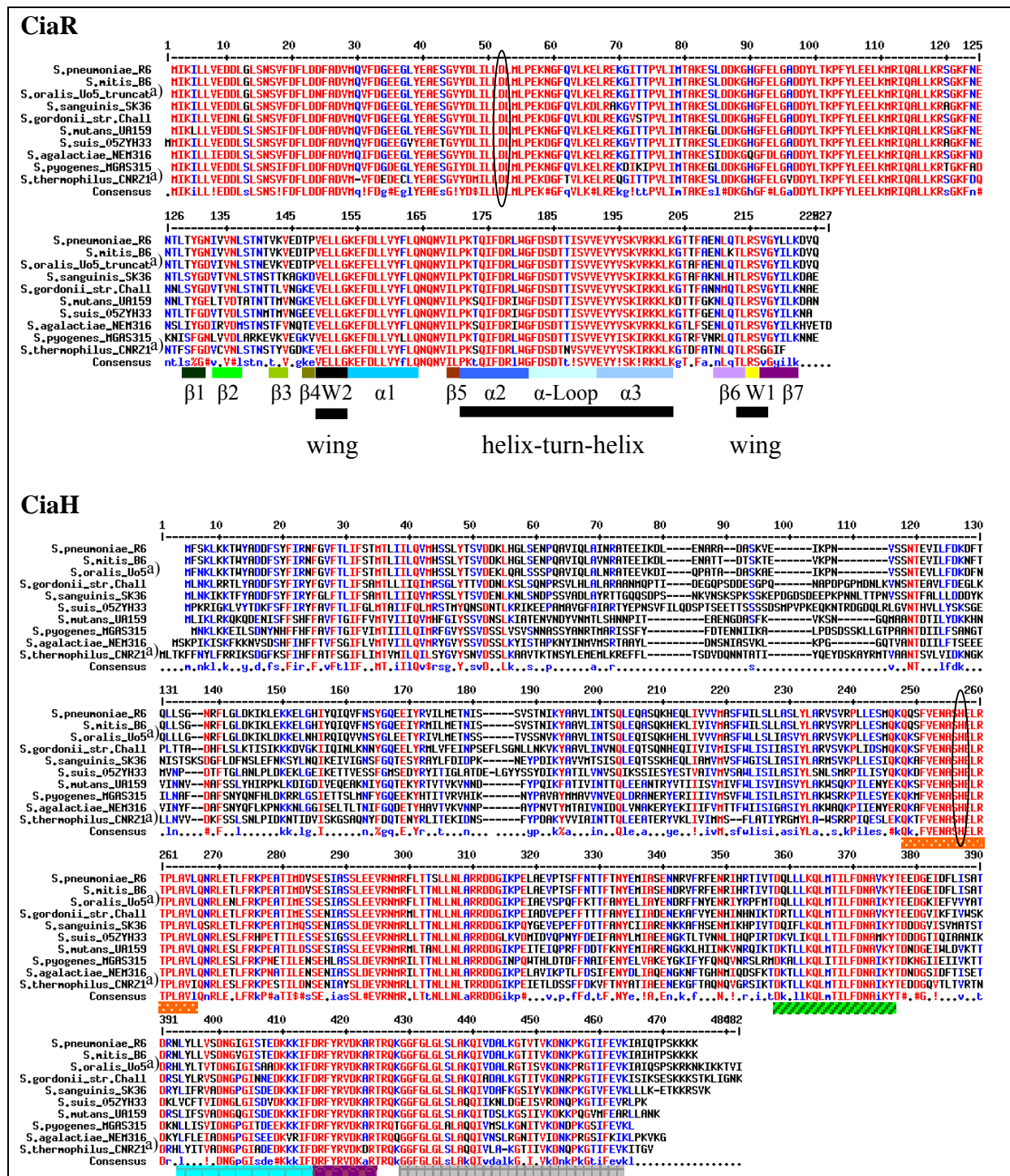


Abb. 5.3: Alignment der Response Regulatoren CiaR und der Histidinkinasen CiaH der Gattung *Streptococcus*. Das Alignment wurde mit MultAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) angefertigt. Identische Aminosäuren sind rot dargestellt, Bereiche mit geringer Homologie blau. Die für den Phosphotransfer wesentlichen Aminosäuren D51 in CiaR und H226 in CiaH (Positionen in *S. pneumoniae* R6) sind markiert. Wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur von CiaR sind eingezeichnet (Martínez-Hackert und Stock, 1997). Die konservierten Homologieboxen in CiaH sind anhand der Homologie zu den entsprechenden Boxen in EnvZ von *E. coli* markiert (Wolain *et al.*, 2002). Die H-Box ist mit einem orangenen Balken unterstrichen, die N-Box mit einem grünen, die D-Box mit einem türkisen, die F-Box mit einem lilanen, die G-Box mit einem grauen. a) Proteine sind verkürzt und wurden aus den einzelnen, nicht zusammenhängenden Teilsequenzen zusammengesetzt.

Allerdings kann das Regulon von CiaRH in den verschiedenen Streptokokken trotzdem unterschiedlich sein. Deshalb wurden die verfügbaren Genomsequenzen von Streptokokken zunächst mit tblastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) mit den Aminosäuresequenzen der Proteine des CiaRH Regulons aus *S. pneumoniae* R6 nach homologen Proteinen durchsucht. Für DltA wurde die Sequenz von *S. pneumoniae* D39 (Lanie *et al.*, 2007) verwendet, da *dltA* in *S. pneumoniae* R6 im Gegensatz zu anderen *S. pneumoniae* Stämmen eine Punktmutation enthält und nicht exprimiert wird (Kovács *et al.*, 2006). Auf eine Suche nach Homologen von *ccnA-E* wurde hier verzichtet, da dazu auch die Faltung der RNAs berücksichtigt werden muss. Das Auffinden von homologen kleinen RNAs gestaltet sich daher deutlich aufwändiger als die Suche nach homologen Proteinen und konnte daher in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Allerdings wurden Homologe der csRNAs außer in *S. pneumoniae* auch bereits in *S. mitis* B6 und *S. sanguinis* SK36 identifiziert (Halfmann *et al.*, 2007b). Außerdem sind auch in allen anderen Streptokokken, von denen eine vollständige Genomsequenz verfügbar ist, Homologe der csRNAs vorhanden (Reinhold Brückner, persönliche Mitteilung).

In Tab. 5.2 sind alle Proteine des CiaRH Regulons mit ihrer Homologie (Identität) zu anderen Streptokokken aufgeführt. Auffallend ist dabei, dass *S. thermophilus* CNRZ1066 kein funktionelles CiaRH Zwei-Komponenten System besitzt, da beide Proteine verkürzt sind. Diese Auffälligkeit ist nicht nur auf den hier untersuchten Stamm beschränkt, sondern ist auch in zwei weiteren Stämmen mit kompletter Genomsequenz, *S. thermophilus* LMG 18311 und *S. thermophilus* LMD-9, vorhanden. Eine Auffälligkeit bezüglich *ciaRH* zeigt sich auch in *S. mutans* UA159 und *S. suis* 05ZYH33. In diesen Stämmen befindet sich im Operon vor *ciaR* jeweils ein zusätzliches Gen für ein kleines Peptid. Die beiden Peptide haben allerdings sehr unterschiedliche Längen von 87 bzw. 35 Aminosäuren und zeigen keine nennenswerte Homologie zueinander.

Das *lic1* Operon, Spr1538a und Spr0782 kommen außer in *S. pneumoniae* nur in *S. mitis* B6 und *S. oralis* Uo5 vor, wobei Teilbereiche von Spr0782 auch in Proteinen der anderen Streptokokken auftauchen. Spr0931 und Axe sind auch nur in einigen Streptokokken vorhanden, während die übrigen Proteine in allen untersuchten Stämmen existieren.

Tab. 5.2: Das CiaRH Regulon in der Gattung *Streptococcus*.

Gen- produkt	<i>S. mitis</i> B6		<i>S. oralis</i> Uo5 ³		<i>S. sanguinis</i> SK36		<i>S. mutans</i> UA159		<i>S. pyogenes</i> MGAS315		<i>S. agalactiae</i> NEM316		<i>S. thermo-philus</i> CNRZ1066		<i>S. suis</i> 05ZYH33		<i>S. gordonii</i> str. Challis substr. CH1	
	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle	Identität ¹	CiaR Bindestelle
ManL	96	+	93	+	87	+	82	-	84	-	83	-	82	-	86	-	90	+
ManM	79	+	76	+	83	+	68	-	76	-	77	-	70	-	77	-	88	+
ManN	76	+	74	+	85	+	68	-	73	-	71	-	72	-	75	-	93	+
CiaR	99	+	95 ²	+	88	-	88	+	84	+	88	+	86 ²	-	88	-	89	-
CiaH	96	+	83 ²	+	60	-	55	+	51	+	52	+	70 ²	-	48	-	65	-
Spr0782	88	+	72	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PpmA	93	+	85	+	62	+	50	+	42	+	48	+	39	+	56	+	64	+
Spr0931	96	+	87 ²	+	69	-	60	-	-	-	63	-	60	-	33	-	-	-
Spr1149	97	+	95	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spr1148	97	+	92	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LicA	93	+	87	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LicB	96	+	91	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LicC	99	+	94	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spr1538a	100	+	40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Axe	92	-	92	+	73	-	-	-	-	-	53	-	-	-	-	-	-	-
Spr1787	97	+	62 ²	-	58	-	57	+ ⁴	54	+ ⁴	57	+ ⁴	56	+ ⁴	57	-	65	-
MalM	98	-	96	-	80	-	56	-	54	-	50	-	56	-	57	-	79	-
MalP	98	-	93	-	88	-	70	-	70	-	68	-	67	-	70	-	92	-
DltX	100	+	67 ²	+	76	-	69	-	50	-	76 ³	-	60	-	-	-	74	-
DltA ⁵	97	+	93	+	86	-	79	-	71	-	78	-	86	-	73	-	87	-
DltB	97	+	87	+	75	-	70	-	59	-	68	-	71	-	66	-	73	-
DltC	79	+	93	+	88	-	88	-	70	-	78	-	87	-	77	-	88	-
DltD	95	+	66	+	61	-	52	-	47	-	49	-	57	-	48	-	63	-
HtrA	98	+	82	+	64	+	54	+	52	+	54	+	57	+	56	+	66	+
ParB	96	+	82	+	54	+	50	+ ⁶	54	+	53	+	51	+	53 ²	+	62	+

¹zu *S. pneumoniae* R6, ermittelt mit tblastn

²truncated

³vorläufige Genomsequenz, daher noch viele Punktmutationen und Frameshifts

⁴homologes Gen ist zweites Gen in einem Operon, CiaR Bindestelle vor erstem Gen

⁵DltA aus *S. pneumoniae* D39

⁶vergrößerte intergene Region zwischen *htrA* und *parB* (Ahn *et al.*, 2005)

Das Vorhandensein der Gene des CiaRH Regulons von *S. pneumoniae* R6 in einem Genom muss jedoch nicht zwangsläufig mit deren CiaR abhängigen Regulation im Zusammenhang stehen. Vielmehr kann das CiaRH Regulon in den verschiedenen Streptokokken unterschiedlich zusammengesetzt sein. Deshalb wurden die genannten Genome mit dem Programm Motif Search (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/>) nach Bindestellen von CiaR durchsucht. Dabei wurde als Suchmuster die Bindestelle von CiaR aus *S. pneumoniae* R6 verwendet, wobei in den genau 5 bp voneinander entfernten Repeats mit der Sequenz TTTAAG jeweils eine Fehlpaarung erlaubt war, in der -10 Region TATAAT zwei. Die -10 Region sollte einen Abstand von 8-10 bp von der CiaR Bindestelle haben. Auf diese Weise identifizierte potentielle Bindestellen, die innerhalb von annotierten Genen lagen oder in

intergenen Regionen, ohne dass der Abstand zum nächsten Gen ausreichend für ein weiteres Gen, beispielsweise eine kleine, nicht-codierende RNA, war, wurden aussortiert. Ebenso wurden potentielle Bindestellen nicht berücksichtigt, wenn in keinem der beiden Teilsequenzen des Repeats ein G vorhanden war. Die Positionen der so in den Genomen von Streptokokken identifizierten Bindestellen, die nicht zu Genen des CiaRH Regulons von *S. pneumoniae* R6 gehören, sind in Tab. 5.3 zusammengestellt. Die zu Genen des CiaRH Regulons von *S. pneumoniae* R6 homologen Gene wurden zudem visuell daraufhin untersucht, ob sie einen CiaR abhängigen Promotor besitzen (Tab. 5.2).

Auffällig ist, dass lediglich die Gene *htrA/parB* und *ppmA* in allen Genomen vorhanden sind und auch einen Promotor mit CiaR Bindestelle besitzen (Tab. 5.2). Allerdings existieren auch in allen Genomen Homologe von *ccnA-E* mit CiaR abhängigen Promotoren, wenn auch die Längen der regulatorischen RNAs und die vorhergesagten Sekundärstrukturen variieren (Reinhold Brückner, persönliche Mitteilung). Das zentrale Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in Streptokokken scheint daher aus den Genen *htrA/parB*, *ppmA* und Genen für kleine, nicht-codierende RNAs zu bestehen.

In mehreren Stämmen besitzen auch *manLMN*, *ciaRH* und *spr1787* potentielle CiaR abhängige Promotoren. In vier Stämmen haben die homologen Gene von *spr1787* dabei eine besondere Organisation, da sie im Gegensatz zu *S. pneumoniae* das zweite Gen in einem Operon sind, vor dem ersten Gen aber ein potentiell CiaR abhängiger Promotor vorhanden ist.

Von den zusätzlichen CiaR Bindestellen, die in den Genomen von Streptokokken identifiziert wurden (Tab. 5.3) scheinen einige zu Promotoren von kleinen nicht-codierenden RNAs zu gehören. Viele der potentiellen Promotoren in Tab. 5.3 sind aber *in vivo* voraussichtlich nicht funktionell. Einige der Promotoren könnten jedoch aufgrund der stromabwärts gelegenen Gene auch besonders interessant sein (s. Tab. 5.3). Beispielsweise sind darunter für die Zellteilung und den Zellwandaufbau wesentliche Gene und für Zwei-Komponenten Systeme codierende Gene. Die offensichtlich innerhalb der Streptokokken unterschiedlich zusammengesetzten CiaRH Regulons könnten eine Anpassung an die verschiedenen Lebensweisen sein.

Einige experimentelle Daten bezüglich des CiaRH Zwei-Komponenten Systems existieren für *S. mutans* (Qi *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2008). In diesem Organismus

scheint im Gegensatz zu *S. pneumoniae* ein entscheidender Einfluss auf die Kompetenz von der Histidinkinase CiaH auszugehen. Kürzlich wurde auch in *S. pyogenes* der Effekt von CiaH auf die Genexpression untersucht (Riani *et al.*, 2007). Eine detailliert Analyse von CiaRH, wie sie für *S. pneumoniae* durchgeführt wurde, existiert aber für keine weiteren Streptokokken.

Tab. 5.3: Positionen potentieller CiaR Bindestellen, welche nicht vor Homologen von Protein codierenden Genen des CiaRH Regulons von *S. pneumoniae* R6 liegen.

Stamm	Position im Genom
<i>S. mitis</i> B6	599400 (ABC transporter), 1351980, 1785340
<i>S. oralis</i> Uo5	14580, 21760, 31740, 76280, 79820, 101420, 143180, 162120, 184940, 243860, 274340, 403000, 531500, 611720, 931200, 947280, 1017380, 1103760, 1324860, 1455560, 1712940, 1714660, 1714960, 1724860, 1759260, 1921760
<i>S. sanguinis</i> SK36	65080, 65300, 67080, 182760 (UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase, putative), 545760, 546060, 611580, 654000, 775980, 1110280, 1298100, 1478400, 1708840, 1743100, 2184020, 2210540
<i>S. mutans</i> UA159	44400, 143740, 249620, 303900, 352000, 454340 (Operon inkl TCS), 602640 (competence protein <i>coiA</i>), 694780, 892860, 937780, 1036440, 1143960, 1338700, 1501320, 1745460, 1757320, 1896980, 1984320, 1990720
<i>S. pyogenes</i> MGAS315	201920, 248640 (oligopeptide permease), 270980, 498080 (FtsE/X in operon), 545360, 1059020, 1137560, 1231840, 1276820, 1287540, 1608220, 1626600, 1694440, 1784380, 1813280
<i>S. agalactiae</i> NEM316	142740, 459740, 507680, 546300 (<i>ftsA/Z</i>), 578960 (similar to cell wall muropeptide branching enzyme, in operon), 588000 (Similar to cell division ATP-binding protein FtsE/X in operon), 622740 (similar to FtsW and RodA proteins), 812780, 1243740, 1307380, 1337060, 1447620 (operon, TCS), 1559200, 1656900, 1663260, 1672180, 1755460, 1763520, 1949300, 1995400 (transcriptional regulator), 2019160 (TCS), 2045720, 2048740, 2052060, 2060340, 2067620, 2160040, 2179180, 2182460
<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066	8560, 42500, 44760, 51260, 51600, 140280, 174320, 294380, 510520, 707780, 966140, 1004160, 1157900, 1166280, 1439380, 1461400, 1768640
<i>S. suis</i> 05ZYH33	52560, 218000, 239440, 278700, 352000, 455920, 722520, 757620, 765440, 1095020, 1206580, 1243600, 1396180, 1431940, 1420240, 1448260 (negative regulator of septation ring formation), 1540660, 1560220, 1609920, 1678840, 1744280, 1745780, 1787100 (glycosyltransferase), 2016520
<i>S. gordonii</i> str. Challis substr. CH1	21620, 116660, 161780, 179800, 465500, 519420, 549360, 549560, 883220, 1278700, 1312220, 1360120, 1494340, 1576140, 1576280, 1702780, 1721760, 1732640, 1744560, 1936080, 2120100, 2132840

5.4 Die Aktivierung von CiaRH

Verschiedene Wachstumsbedingungen bewirken auch bei *S. pneumoniae* eine Veränderung der Genexpression und das Auftreten bestimmter Phänotypen. Beispielsweise entwickelt *S. pneumoniae* R6 im Gegensatz zu C-Medium in THB Medium keine Kompetenz, wobei die Transformierbarkeit durch die Inaktivierung von *ciaR* wieder hergestellt werden kann (Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2005). Von Oggioni *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass zwischen planktonisch wachsenden und an einer Oberfläche anhaftenden Zellen von *S. pneumoniae* ein gravierender Unterschied in der Genexpression besteht. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass in Zellen, die auf einer Agaroberfläche wachsen, *ciaR* höher transkribiert wird, als in Zellen, die in Flüssigmedium angezogen werden. Eine Abhängigkeit der Aktivität des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von den Wachstumsbedingungen ist daher offensichtlich.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die Aktivität einzelner Promotoren des CiaRH Regulons von *S. pneumoniae* R6 in THY Medium und auf D-Blutagar mit der Aktivität in C-Medium verglichen. Es zeigte sich, dass in THY Medium die Expression der Promotoren kaum verändert ist, in Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Transkriptomstudien (Mascher *et al.*, 2003; Heintz, 2006). Allerdings zeigte P_{htrA} immerhin einen 1,6fachen Anstieg der Aktivität in THY-Medium. Da, wie bereits zuvor erläutert, die Deletion von *htrA* die Transformierbarkeit in THY Medium wieder herstellt (Schäfer, 2007), scheint der geringe Anstieg der Expression von *htrA* auszureichen, um die Entwicklung der natürlichen Kompetenz zu verhindern. Auf D-Agar zeigen P_{htrA} , aber auch die anderen untersuchten Promotoren P_{ccnC} und $P_{1_{spr1149}}$, einen deutlich stärkeren Anstieg ihrer Aktivität. Die 5,84fache Zunahme der von P_{htrA} ausgehenden Expression lässt auf eine starke Aktivierung von CiaRH schließen. Der Zusammenhang zwischen den Lebensbedingungen von *S. pneumoniae* und dem Aktivierungszustand von CiaRH ist somit eindeutig. Eine Untersuchung des Aktivierungszustandes von CiaRH unter natürlicheren Lebensbedingungen als in Flüssigmedium oder auf einer Agarplatte wäre daher sinnvoll. Beispielsweise existieren keine Daten über die Expression des CiaRH Regulons während der Biofilmbildung.

Ebenso gibt es bisher keine Erkenntnisse über das genaue Signal, das von CiaH detektiert wird. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass CiaH Zellwandstress detektiert und ein einzelnes konkretes Signal nicht existiert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2008). Jedoch wurde auch schon der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen diskutiert (Giammarinaro

et al., 1999). Auch ein Peptid ist als Signal für CiaH denkbar. Sowohl in *S. mutans*, als auch in *S. suis* ist in einem Operon mit *ciaRH* auch das Gen eines kleinen Peptids codiert. Die Organisation eines Zwei-Komponenten Systems und seines Signalpeptid in einem gemeinsamen Operon findet sich beispielsweise auch bei ComCDE von *S. pneumoniae*. Dessen ungeachtet sind Ansätze zur eindeutigen Identifizierung eines Signals von CiaH schwierig. Vielmehr können detailliertere Untersuchungen zum Ablauf des Phosphotransfers von CiaH zu CiaR weitere Erkenntnisse zur Funktionsweise des Zwei-Komponenten Systems CiaRH liefern.

Von den Response Regulatoren der OmpR-Familie, zu der CiaR gehört, ist bekannt, dass die Phosphorylierung eines konservierten Aspartatrestes im Allgemeinen zur Aktivierung und damit einhergehend zur spezifischen DNA-Bindung der Regulatoren führt (Delgado *et al.*, 1993; Dalton und Scott, 2004; Depardieu *et al.*, 2005; Gusa *et al.*, 2006; Eldakak und Hulett, 2007). Durch die Phosphorylierung wird die Dimerisierung stimuliert und die aktive Konformation stabilisiert (Bachhawat und Stock, 2007). Der für die Phosphorylierung wichtigste Aspartatrest im Response Regulator OmpR ist D55, aber auch die Phosphorylierung des Aspartatrestes D11 beeinflusst die Aktivität von OmpR, vor allem in Abwesenheit von D55 (Delgado *et al.*, 1993). Für CiaR wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch in diesem Regulator der OmpR-Familie die zur DNA-Bindung und damit zur Aktivierung von Promotoren notwendige Phosphorylierung an der zu D55 in OmpR entsprechenden Aminosäure D51 erfolgt. Die stark CiaR abhängigen Promotoren P_{htrA} , P_{ccnC} und $P_{spr0931}$ zeigten in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A fast keinerlei Aktivität. Die geringe Restaktivität könnte durch eine Aktivierung durch Phosphorylierung an einer anderen Aminosäure, beispielsweise D11, erklärbar sein (Delgado *et al.*, 1993). Um sicherzustellen, dass der Verlust der Fähigkeit an DNA zu binden tatsächlich nur durch den Aminosäureaustausch D51A und damit verbunden durch einen Verlust der Phosphorylierbarkeit des Proteins zu erklären ist, sollte mittels Western Blot gezeigt werden, dass das Protein CiaRD51A in *S. pneumoniae* R6 CiaRD51A noch vorhanden ist und nicht instabil ist oder abgebaut wurde. Da die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen CiaR jedoch nicht mehr funktionell waren, gelang dieser Nachweis nicht und sollte mit neuen Antikörpern wiederholt werden.

Im Gegensatz zu *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* mit inaktiviertem Gen des Response Regulators CiaR zeigte der Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* mit inaktiviertem Gen der Histidinkinase CiaH in einer Transkriptomstudie kaum Veränderungen zum Wildtyp (Heintz,

2006). Dieses Ergebnis ist überraschend, da in einem typischen Zwei-Komponenten System der Response Regulator von seiner dazugehörigen Histidinkinase phosphoryliert wird. Die Abwesenheit der Kinase sollte daher zu einer Abnahme der Aktivität des Regulators führen. In dieser Arbeit wurde mittels β -Galaktosidaseassays gezeigt, dass die Promotoren des CiaRH Regulons in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* praktisch dieselbe Aktivität besitzen wie im Wildtyp. Die vorangegangene Transkriptomstudie bestätigend, scheint von CiaH somit tatsächlich kein entscheidender Effekt auf CiaR auszugehen. Jedoch wurde zuvor durch die Mutagenese der Aminosäure D51 von CiaR gezeigt, dass ohne eine Phosphorylierung von CiaR eine deutlich herabgesetzte DNA-Bindung und fast keine Aktivität der CiaR abhängigen Promotoren zu beobachten ist. Daher stellt sich die Frage, auf welchem Weg die notwendige Phosphorylierung von CiaR erfolgt.

Eine Möglichkeit wäre die Phosphorylierung durch „cross-talk“ oder „cross-regulation“ einer anderen Histidinkinase. Eine Verbindung von CiaRH mit TCS03 und TCS13 wurde bereits vermutet (Heintz, 2006). Die Bestimmung der Aktivität eines der in dieser Arbeit hergestellten Reporterkonstrukte mit stark CiaR abhängigen Promotoren in einem Stamm, in dem zusätzlich zu *ciaH* ein weiteres Gen einer Histidinkinase inaktiviert wurde (Heintz, 2006), könnte weitere Erkenntnisse über die Verbindung der Zwei-Komponenten Systeme liefern. Außerdem könnte die Durchführung eines „Phosphotransfer Profiling“ (Skerker *et al.*, 2005; Laub und Goulian, 2007) die Frage des „cross-talks“ in *S. pneumoniae* vermutlich beantworten. Dazu müssten zunächst die 13 Histidinkinasen und die 14 Response Regulatoren von *S. pneumoniae* aufgereinigt werden. In einem *in vitro* Assay könnte dann überprüft werden, zwischen welchen Histidinkinasen und Response Regulatoren ein Phosphotransfer möglich ist. Da die Spezifität von Histidinkinasen / Response Regulator Paaren *in vivo* größer ist als *in vitro*, müssten in diesem Experiment mögliche „cross-talk“ Vorgänge eindeutig zu identifizieren sein.

Die meisten Response Regulatoren können aber auch von kleinen Phosphodonoren wie Acetylphosphat phosphoryliert werden (McCleary *et al.*, 1993; Wolfe, 2005; Laub und Goulian, 2007). *In vitro* existieren nur sehr wenige Ausnahmen von dieser Regel, wie beispielsweise der Response Regulator PhoP von *Bacillus subtilis*, welcher sich *in vitro* nicht durch Acetylphosphat phosphorylieren lässt (Liu und Hulett, 1997). Der Nachweis der Phosphorylierung eines Response Regulators durch Acetylphosphat *in vivo* fällt deutlich schwerer. Allerdings existieren viele Daten, die einen klaren Zusammenhang zwischen dem

intrazellulären Acetylphosphatpool, welcher beispielsweise von der Wachstumsphase und dem Nährstoffangebot abhängt, und der Aktivierung bestimmter Response Regulatoren erkennen lassen (Wolfe, 2005; Laub und Goulian, 2007). In *E. coli* wird Acetylphosphat über die Enzyme Pta (Phosphat-Acetyltransferase) und AckA (Acetatkinase / ATP:Acetat Phosphotransferase) synthetisiert (Wolfe, 2005; s. Abb.4.44). *S. pneumoniae* besitzt zwar auch diese Enzyme, jedoch wurde von Perricone *et al.* (2003) gezeigt, dass während des aeroben Wachstums 85 % des von *S. pneumoniae* gebildeten Acetylphosphats aus einer von der Pyruvatoxidase SpxB katalysierten Reaktion stammen. Bei dieser Reaktion entsteht auch toxisches H₂O₂, gegen welches wiederum SpxB selbst Resistenz vermittelt (Perricone *et al.*, 2003). Das entstehende H₂O₂ wurde für das Absterben von *S. pneumoniae* in der stationären Wachstumsphase verantwortlich gemacht (Regev-Yochay *et al.*, 2007). Verschiedene Allele des Gens *spxB*, dessen Expression unter Kontrolle des transkriptionellen Regulators SpxR steht (Ramos-Montañez *et al.*, 2008), haben außerdem einen Einfluss auf die bereits von Avery *et al.* (1944) beobachtete raue bzw. glatte Morphologie der Kolonien von *S. pneumoniae* (Belanger *et al.*, 2004; Ramos-Montañez *et al.*, 2008). Beobachtet wurde auch ein Einfluss von SpxB auf die Virulenz und die Kompetenz (Spellerberg *et al.*, 1996; Regev-Yochay *et al.*, 2007; Ramos-Montañez *et al.*, 2008; Bättig und Mühlemann, 2008). Die Inaktivierung von *spxB* hatte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Expression CiaR abhängiger Promotoren. Da beobachtet wurde, dass der Einfluss von Acetylphosphat auf die Phosphorylierung eines Response Regulators meist nur dann deutlich wird, wenn die dazugehörige Histidinkinase nicht vorhanden ist (Laub und Goulian, 2007), wurde die Expression CiaR abhängiger Promotoren auch in einem Stamm untersucht, in welchem sowohl *spxB*, als auch *ciaH* inaktiviert waren (*S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ciaH::aad9*). Dieser Stamm zeigte ein deutlich verlangsamtes Wachstum und eine leicht reduzierte Aktivität CiaR abhängiger Promotoren. Dies könnte darauf hindeuten, dass in Abwesenheit der Histidinkinase CiaH Acetylphosphat tatsächlich einen Einfluss auf die Phosphorylierung von CiaR haben könnte. Jedoch konnte die Inaktivierung von *spxB* die Frage nach der Herkunft des Phosphats zur Phosphorylierung von CiaR nicht zufriedenstellend klären. Da *S. pneumoniae* über weitere, SpxB unabhängige Synthesewege für Acetylphosphat verfügt (s. Abb. 4.44), könnte das noch vorhandene Acetylphosphat für die effektive Phosphorylierung von CiaR ausreichend sein. Das zusätzliche Ausschalten der Gene *ackA* und *pta* könnte zu einer weiteren, entscheidenden Reduzierung des Acetylphosphatpools in *S. pneumoniae* und damit eventuell zu einer weiteren Reduzierung der Phosphorylierung von CiaR und der Aktivität CiaR abhängiger Promotoren führen.

Von Heintz (2006) wurde in einer Transkriptomstudie gezeigt, dass sich die Expression einiger *cia*-abhängiger Gene vor allem in der stationären Wachstumsphase verändert. Zudem wurde in mehreren Reporterassays eine verstärkte Expression des Promotors P_{spr1149} in der stationären Phase beobachtet (Mascher *et al.*, 2003; Halfmann, 2004). Daher wurde das Expressionsverhalten einiger ausgewählter stark CiaR abhängiger Promotoren während des Wachstums untersucht. Dadurch konnte mittels β -Galaktosidaseassays bestätigt werden, dass die Expression des CiaRH Regulons in der stationären Wachstumsphase im Vergleich zum exponentiellen Wachstum erhöht ist. Zudem konnte der Zeitpunkt des CiaRH abhängigen Aktivitätsanstiegs genauer definiert werden, da die Promotoren P_{htrA}, P_{ccnA}, P_{ccnE} und P_{spr1149} exakt beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase einen deutlichen Anstieg in ihrer Aktivität zeigten. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt eine Aktivierung von CiaR erfolgt, welche möglicherweise durch eine veränderte Aktivität von CiaH bedingt sein könnte. Tatsächlich zeigten die Promotoren P_{htrA}, P_{ccnA} und P_{ccnE} in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* den im Wildtyp beobachteten Anstieg ihrer Aktivität zu Beginn der stationären Wachstumsphase nicht. P_{spr1149} stellte jedoch einen Sonderfall dar. Dieser Promotor zeigte auch bei inaktiviertem *ciaH* einen Anstieg der Expression in der stationären Wachstumsphase, wenn auch dieser geringer ausfiel als im Wildtyp. Vermutlich ist dieser zusätzliche, unabhängig von CiaRH erfolgende Anstieg auf eine weitere, auf TCS11 zurückgehende Regulation an P_{spr1149} zurückzuführen (Volz, 2008). Trotz seiner Besonderheiten zeigt das Verhalten von P_{spr1149} ebenso wie das von P_{htrA}, P_{ccnA} und P_{ccnE}, dass beim Übergang vom exponentiellen zum stationären Wachstum die Histidinkinase CiaH ein Signal empfangen muss, welches dazu führt, dass CiaR in stärkerem Maße phosphoryliert wird.

Unklar bleibt dabei, ob CiaH in der stationären Wachstumsphase eine verstärkte Kinaseaktivität oder eine verminderte Phosphataseaktivität besitzt, was beides in einer stärkeren Phosphorylierung von CiaR resultieren würde. Da die Inaktivierung von *ciaH* effektiv keinen Einfluss auf die Aktivität CiaR abhängiger Promotoren während des exponentiellen Wachstums hat, ist für *S. pneumoniae* die Kinaseaktivität von CiaH in dieser Wachstumsphase offensichtlich verzichtbar. Die Summe der Kinase- und Phosphataseaktivität, durch welche eine unspezifische Phosphorylierung des Response Regulators wieder beseitigt wird (Laub und Goulian, 2007), ist etwa null. Auch von anderen Histidinkinasen wie VanS aus *Streptomyces coelicolor* ist bekannt, dass sie ohne Vorhandensein eines Signal hauptsächlich als Phosphatase agieren (Hutchings *et al.*, 2006). Zuvor wurde angenommen, dass das Allel *ciaH*^{C306} für ein Protein mit verminderter

Phosphataseaktivität codiert (Guenzi *et al.*, 1994), was dazu führt, dass eine beispielsweise von Acetylphosphat verursachte unspezifische Phosphorylierung von CiaR nicht beseitigt werden kann. Tatsächlich werden CiaR abhängige Gene in *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306} stärker exprimiert als im Wildtyp. Obwohl die Aktivität CiaR abhängiger Promotoren in diesem Stamm bereits während des exponentiellen Wachstums stärker ist, als die der Promotoren im Wildtyp in der stationären Phase, ist auch in *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306} nochmals eine Expressionszunahme bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase zu beobachten. Dies zeigt, dass unter der Annahme, dass in diesem Stamm CiaH tatsächlich keine Phosphataseaktivität besitzt, eine Zunahme der Kinaseaktivität für den Expressionsanstieg in der stationären Wachstumsphase verantwortlich sein muss. Somit scheint CiaH während des exponentiellen Wachstums verzichtbar zu sein, da sich das CiaRH Regulon auch in Abwesenheit der Kinase auf einem etwa gleichen Basisniveau der Aktivierung befindet. Entscheidend ist CiaH hingegen bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, da durch die sich dann grundlegend verändernden Lebensbedingungen CiaH ein Signal perzipiert, welches eine vermehrte Kinaseaktivität verursacht und schließlich in einer verstärkten Expression des CiaRH Regulons resultiert.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Bindestelle des Zwei-Komponenten Systems CiaRH eindeutig identifiziert. DNA-Footprinting Experimente könnten diese Ergebnisse aber noch vervollständigen. Die Identifizierung der Gene des CiaRH Regulons stellt nun die Basis für eine systematische funktionelle Charakterisierung der Genprodukte dar. Insbesondere muss der Einfluss von HtrA und csRNA1-5 auf die Kompetenz detailliert analysiert werden. Aber auch die Untersuchung der Genprodukte mit unbekannter Funktion, wie beispielsweise Spr0931 und Spr1787, könnte interessante Erkenntnisse über eventuell vorhandene Zusammenhänge mit den von CiaRH vermittelten Phänotypen liefern.

Weiter untersucht werden sollte auch die Phosphorylierung von CiaR. Mittels „Phosphotransfer Profiling“ könnte die Möglichkeit des „cross-talks“ in *S. pneumoniae* untersucht werden. Das Ausschalten der Synthesewege von Acetylphosphat könnte die Rolle dieses Phosphodonors bei der Aktivierung von CiaR klären. Einer weiteren Betrachtung bedürfen auch die Vorgänge, die bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase eine weitere Aktivierung des CiaRH Regulons bewirken. In diesem Zusammenhang könnte auch auf die in Anwesenheit von bestimmten PBP Mutationen erfolgende Aktivierung von CiaRH (Heintz, 2006) eingegangen werden, da dabei die Zellhülle ebenso wie in der stationären Phase einem besonderen Stress ausgesetzt ist. Eine genaue Analyse der Veränderungen in der Zellwand unter diesen Umständen könnte möglicherweise weitere Hinweise auf die von CiaH detektierten Signale liefern. Interessant wäre auch die Analyse von CiaRH unter anderen Wachstumsbedingungen. Insbesondere der Aktivierungszustand während der Biofilmbildung könnte Informationen darüber liefern, wie aktiv CiaRH unter natürlicheren Lebensbedingungen ist.

Einer detaillierten Analyse bedarf das CiaRH Regulon auch in anderen Streptokokken. Von Interesse wäre die experimentelle Identifizierung der CiaR Bindestellen und damit der CiaRH Regulons in diesen Organismen. Unterschiede in der Funktionsweise könnten sich beispielsweise durch Einbringen der CiaR und CiaH Proteine aus den anderen Streptokokken in *S. pneumoniae* R6 untersuchen lassen. Dabei könnten eventuell auch Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die in ihren Sensordomänen sehr verschiedenen CiaH Proteine auch unterschiedliche Signale wahrnehmen.

6 Literaturverzeichnis

- 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(8):4760-4799.
- Abranches, J., Candella, M.M., Wen, Z.T., Baker, H.V., Burne, R.A. (2006) Different roles of EIIABMan and EIIGlc in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 188(11):3748-3756.
- Ahn, S.J., Lemos, J.A., Burne, R.A. (2005) Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. J. Bacteriol. 187(9):3028-3038.
- Ahn, S.J., Wen, Z.T., Burne, R.A. (2006) Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. Infect. Immun. 74(3):1631-1642.
- Ajdić, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savić, G., Chang, J., Carson, M.B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B.A., Ferretti, J.J. (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(22):14434-14439.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G. H., Margalit, H., Altuvia, S. (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. Current Biology 11: 941-950.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79: 137-158.
- Bachhawat, P., Stock, A.M. (2007) Crystal structures of the receiver domain of the response regulator PhoP from *Escherichia coli* in the absence and presence of the phosphoryl analog beryllofluoride. J. Bacteriol. 189(16):5987-5995.
- Barrett, J.F., Hoch, J.A. (1998) Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 42(7):1529-1536.
- Bättig, P., Mühlemann, K. (2008) Influence of the *spxB* gene on competence in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 190(4):1184-1189.

- Biswas, I., Drake, L., Erkina, D., Biswas, S. (2008) Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 190(1):68-77.
- Belanger, A.E., Clague, M.J., Glass, J.I., Leblanc, D.J. (2004) Pyruvate oxidase is a determinant of Avery's rough morphology. J. Bacteriol. 186(24):8164-8171.
- Bensing, B. A., Meyer, B. J., Dunny, G. M. (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7794-7799.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3. Nature 417(6885):141-147.
- Beres, S.B., Sylva, G.L., Barbian, K.D., Lei, B., Hoff, J.S., Mammarella, N.D., Liu, M.Y., Smoot, J.C., Porcella, S.F., Parkins, L.D., Campbell, D.S., Smith, T.M., McCormick, J.K., Leung, D.Y., Schlievert, P.M., Musser, J.M. (2002) Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(15):10078-10083.
- Bergmann, S., Hammerschmidt, S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. Microbiology 152(Pt 2):295-303.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 24;7(6):1513-1523.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltzman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Nat. Biotechnol. 22(12):1554-1558.
- Bourret, R.B. (2006) Census of Prokaryotic Senses. J Bacteriol. 188(12): 4165–4168.

-
- Bradford, M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
 - Breier, A.M., Grossman, A.D. (2007) Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* 64(3):703-718.
 - Cai, S.J., Inouye, M. (2002) EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 277 (27): 24155-24161.
 - Chang, C., Stewart, R.C. (1998) The Two-Component System. *Plant Physiol.* 117: 723-731.
 - Chen, C., Tang, J., Dong, W., Wang, C., Feng, Y., Wang, J., Zheng, F., Pan, X., Liu, D., Li, M., Song, Y., Zhu, X., Sun, H., Feng, T., Guo, Z., Ju, A., Ge, J., Dong, Y., Sun, W., Jiang, Y., Wang, J., Yan, J., Yang, H., Wang, X., Gao, G.F., Yang, R., Wang, J., Yu, J. (2007) A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE.* 2(3):e315.
 - Chen, J.D., Morrison, D.A. (1988) Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene.* 64(1):155-164.
 - Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16(20):9677-9686.
 - Claverys, J.P., Dintilhac, A., Pestova, E.V., Martin, B., Morrison, D.A. (1995) Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*, using an ami test platform. *Gene* 164:123-128.
 - Claverys, J.P., Havarstein, L.S. (2002) Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* 7:1798-1814.
 - Claverys, J.P., Prudhomme, M., Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:451-475.
 - Claverys, J.P., Martin, B., Havarstein, L.S. (2007) Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol. Microbiol.* 64(6):1423-1433.
 - Claverys, J.P., Havarstein, L.S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol.* 5(3):219-229.
 - 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(4):1071-1086.
- Damjanovic, M., Kharat, A.S., Eberhardt, A., Tomasz, A., Vollmer, W. (2007) The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189(19):7105-7111.
 - Degrassi, G., Kojic, M., Ljubijankic, G., Venturi, V. (2000) The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belongs to a family of esterases with broad substrate specificity. *Microbiology* 146 (Pt 7):1585-1591.
 - Delgado, J., S. Forst, S. Harlocker, and E. Inouye. (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.
 - Depardieu, F., Courvalin, P., Kolb, A. (2005) Binding sites of VanRB and sigma70 RNA polymerase in the vanB vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524. *Mol. Microbiol.* 57(2):550-564.
 - de Saizieu, A., Gardès, 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(17):4696-4703.
 - Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(7):2384-2389.
 - Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T., von Aulock, S. (2006) Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 281(45):33849-33859.
 - Dubnau, D., Losick, R. (2006) Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* 61(3):564-572.
 - Echenique, J.R., Trombe, M.C. (2001) Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J. Bacteriol.* 183(15):4599-4608.
 - Eldakak, A., Hulett, F.M. (2007) Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189(2):410-421.
 - Erni, B. (2006) The mannose transporter complex: an open door for the macromolecular invasion of bacteria. *J. Bacteriol.* 188(20):7036-7038.

-
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., et al. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270(5235):397-403.
 - Galperin, M.Y. (2006) Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. *J Bacteriol.* 188(12): 4169–4182.
 - Gasc, A.M., Giammarinaro, P., Richter, S., Sicard, M. (1998) Organization around the *dnaA* gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 144:433-439.
 - Giammarinaro, P., Sicard, M. and 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.
 - Gilmour, R., Foster, J.E., Sheng, Q., McClain, J.R., Riley, A., Sun, P.M., Ng, W.L., Yan, D., Nicas, T.I., Henry, K., Winkler, M.E. (2005) New class of competitive inhibitor of bacterial histidine kinases. *J. Bacteriol.* 187(23):8196-8200.
 - Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couvé, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F. (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol. Microbiol.* 45(6):1499-1513.
 - Gottesman, S. (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:303-328.
 - Grebe, T.W., Stock, J.B. (1999) The Histidine Kinase Superfamily. *Adv. Microb. Phys.* 41:139-227.
 - Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27:95-108.
 - 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(3):505-515.
 - Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., Claverys, J.P. (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(24):8710-8715.
 - Gusa, A.A., Gao, J., Stringer, V., Churchward, G., Scott, J.R. (2006) Phosphorylation of the group A Streptococcal CovR response regulator causes dimerization and promoter-specific recruitment by RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 188(13):4620-4626.

- 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(23):8205-8210.
- Hakenbeck, R., Grebe, T., Zähner, D., Stock, J.B. (1999) β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. Mol. Microbiol. 33(4): 673-678.
- Halfmann, A. (2004) Evaluierung eines Reportersystems für *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Halfmann, A., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2007a) A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. 268(2):217-224.
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2007b) Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. Mol. Microbiol. 66(1):110-126.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166(4):557-580.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., Morrison, D.A. (1995) An Unmodified Heptadecapeptide Pheromone Induces Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl. Acad. Sci. 92(24): 11140-11144.
- Heintz, M. (2006) Das Zwei Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Hendriksen, W.T., Silva, N., Bootsma, H.J., Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., de Jong, A., Kuipers, O.P., Hermans, P.W., Mitchell, T.J. (2007) Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent. J. Bacteriol. 189(4):1382-1389.
- Hermans, P.W., Adrian, P.V., Albert, C., Estevão, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H., Kamphausen, T., Hammerschmidt, S. (2006) The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. J. Biol. Chem. 281(2):968-976.
- Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. Current Opinion in Microbiology 3:165-170.
- Hoskins, J., Alborn, W.E. Jr., Arnold, J., Blaszczyk, 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(19):5709-5717.
- Howell, A., Dubrac, S., Andersen, K.K., Noone, D., Fert, J., Msadek, T., Devine, K. (2003) Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol. Microbiol.* 49:1639-1655.
 - Hutchings, M.I., Hong, H.J., Buttner, M.J. (2006) The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 59(3):923-935.
 - Ibrahim, Y.M., Kerr, A.R., McCluskey, J., Mitchell, T.J. (2004a) Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 72(6):3584-3591.
 - Ibrahim, Y.M., Kerr, A.R., McCluskey, J., Mitchell, T.J. (2004b) Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 186(16): 5258-5266.
 - Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessières, P., Bolotin, A., Monnet, V., Gardan, R. (2007) A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* 153(Pt 11):3631-3644.
 - Ireton, K., Gunther, N.W. 4th, Grossman, A.D. (1994) *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176(17):5320-5329.
 - Jedrzejak, M.J. (2001) Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 187-207.
 - Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F., Wenzel, R.P. (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit - a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 3: 14.
 - Jordan, S., Rietkötter, E., Strauch, M.A., Kalamorz, F., Butcher, B.G., Helmann, J.D., Mascher, T. (2007) LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 153(8):2530-2540.
 - Jordan, S., Hutchings, M.I., Mascher, T. (2008) Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(1):107-146.

- Kato, A., Tanabe, H., Utsumi, R. (1999) Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J. Bacteriol.* 181(17):5516-5520.
- Kenney, L.J. (2002) Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(2):135-141.
- Khandavilli, S., Homer, K.A., Yuste, J., Basavanna, S., Mitchell, T., Brown, J.S. (2008) Maturation of *Streptococcus pneumoniae* lipoproteins by a type II signal peptidase is required for ABC transporter function and full virulence. *Mol. Microbiol.* 67(3):541-557.
- Kharat, 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(1):93-107.
- Klein, D.L. (1999) Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. *Microb Drug Resist.* 5(2):147-157.
- Klier, A., Msadek, T., Rapoport, G. (1992) Positive regulation in the gram-positive bacterium: *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:429-459.
- Kloosterman, T.G., van der Kooi-Pol, M.M., Bijlsma, J.J.E., Kuipers, O.P. (2007) The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn²⁺ stress by activation of the Zn²⁺-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 65(4): 1049–1063.
- Knutsen, E., Ween, O., Håvarstein, L.S. (2004) Two Separate Quorum-Sensing Systems Upregulate Transcription of the Same ABC Transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 186(10):3078-3085.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A., Weiss, J.P. (2006) Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188(10):3622-3630.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188(16):5797-5805.
- Kreikemeyer, B., Boyle, M.D., Buttaro, B.A., Heinemann, M., Podbielski, A. (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol. Microbiol.* 39(2):392-406.

-
- Lacks, S., Hotchkiss, R.D. (1960) A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta*. 39:508-518.
 - 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.
 - Lanie, J.A., Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., Winkler, M.E. (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* 189(1):38-51.
 - Laub, M.T., Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* 41:121-145.
 - Leonard, T.A., Møller-Jensen, J., Löwe, J. (2005) Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360(1455):523-535.
 - Liu, W., Hulett, F.M. (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J Bacteriol.* 179: 6302-6310.
 - Livny, J., Yamaichi, Y., Waldor, M.K. (2007) Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J. Bacteriol.* 189(23):8693-8703.
 - López, R., García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(5):553-580.
 - Lortie, L.A., Pelletier, M., Vadeboncoeur, C., Frenette, M. (2000) The gene encoding IIAB(Man)L in *Streptococcus salivarius* is part of a tetracistronic operon encoding a phosphoenolpyruvate: mannose/glucose phosphotransferase system. *Microbiology* 146 (Pt 3):677-685.
 - 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. USA.* 89(2):718-722.
 - Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R., Reichmann, P. (2007) Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189(21):7741-7751.
 - Ma, Z., Zhang, J.R. (2007) RR06 activates transcription of *spr1996* and *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189(6):2497-2509.

- Majdalani, N., Vanderpool, C.K., Gottesman, S. (2005) Bacterial small RNA regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40(2):93-113.
- Mangold, M., Siller, M., Roppenser, B., Vlamincx, B.J., Penfound, T.A., Klein, R., Novak, R., Novick, R.P., Charpentier, E. (2004) Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol. Microbiol.* 53(5):1515-1527.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 202-218.
- Marra, A., Jyoti, A., Bartilson, M., Lawson, S., Fang, F., Christine, J., Wiesner, J., 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.
- Martens, P., Worm, S.W., Lundgren, B., Konradsen, H.B., Benfield, T. (2004) Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect. Dis.* 4(1):21.
- Martínez-Hackert, E., Stock, A.M. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol.* 269(3):301-312.
- Martín-Galiano, A.J., Overweg, K., Ferrándiz, M.J., Reuter, M., Wells, J.M., de la Campa, A.G. (2005) Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 151(Pt 12):3935-3946.
- Mascher, T. (2001) Das *cia*-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Mascher, T., Zähner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A., Hakenbeck, R. (2003) *Streptococcus pneumoniae cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* 185: 60-70.
- Mascher, T. (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 264(2):133-144.
- Mascher, T., Heintz, M., Zähner, D., Merai, M., Hakenbeck, R. (2006a) 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(5):1959-1968.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G. (2006b) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(4):910-938.

-
- Mattison, K., Oropeza, R., Kenney, L.J. (2002) The Linker Region Plays an Important Role in the Interdomain Communication of the Response Regulator OmpR. *J. Biol. Chem.* 277(36):32714-32721.
 - McCleary, W.R., Stock, J.B., Ninfa, A.J. (1993) Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 175(10):2793-2798.
 - McCleary, W.R., Stock, J.B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* 269(50):31567-31572.
 - 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(6):1661-1675.
 - McKessar, S.J, Hakenbeck, R. (2007) The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* 189(4):1342-1350.
 - Merai, M. (2003) Analyse von Zielgenen des Zwei Komponenten Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
 - Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press, New York.
 - Mitchell, T.J. (2003) The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1(3):219-230.
 - Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4(2):161-168.
 - Ng, W.L., Tsui, H.C., Winkler, M.E. (2005) Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187(21):7444-7459.
 - Nieto, C., Espinosa, E., Puyet, A. (1997) The Maltose/Maltodextrin Regulon of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 272: 30860-30865.
 - Nieto, C., Puyet, A., Espinosa, E. (2001) MalR-mediated Regulation of the *Streptococcus pneumoniae malMP* Operon at Promoter P_M. *J. Biol. Chem.* 276: 14946-14954.
 - Novak, R., Charpentier, E., Braun, J.S., Tuomanen, E. (2000) Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol. Cell.* 5(1):49-57.

- Oggioni, M.R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., Andrew, P.W., Pozzi, G. (2006) Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 61(5):1196–1210
- Opdyke, J.A., Scott, J.R., Moran, C.P. Jr. (2003) Expression of the Secondary Sigma Factor σ^X in *Streptococcus pyogenes* Is Restricted at Two Levels. *J. Bacteriol.* 185: 4291-4297.
- Ottolenghi, E. Hotchkiss, R.D. (1962) Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med.* 116: 491-519.
- Overweg, K., Kerr, A., Sluijter, M., Jackson, M.H., Mitchell, T.J., de Jong, A.P., de Groot, R., Hermans, P.W. (2000) The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect. Immun.* 68(7):4180-4188.
- 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(4):355-363.
- Perego, M., Hoch, J.A. (1996) Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends Genet.* 12(3):97-101.
- Pericone, C.D., Park, S., Imlay, J.A., Weiser, J.N. (2003) Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185(23):6815-6825.
- Peschke, U., Beuck, V., Bujard, H., Gentz, R., Le Grice, S. (1985) Efficient Utilization of *Escherichia coli* Transcriptional Signals in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol.* 186: 547-555.
- 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(4):1051-1070.
- 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(8):4895-4899.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.P. (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313(5783):89-92.

-
- Ramos-Montañez, S., Tsui, H.C., Wayne, K.J., Morris, J.L., Peters, L.E., Zhang, F., Kazmierczak, K.M., Sham, L.T., Winkler, M.E. (2008) Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 67(4):729-746.
 - Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Thompson, C.M., Lipsitch, M., Malley, R. (2007) SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an *in vivo* competitive colonization model. *J. Bacteriol.* 189(18):6532-6539.
 - Reichmann, P., Hakenbeck, R. (2000) Allelic variation in a peptide-inducible two-component system of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190(2):231-236.
 - Riani, C., Standar, K., Srimuang, S., Lembke, C., Kreikemeyer, B., Podbielski, A. (2007) Transcriptome analyses extend understanding of *Streptococcus pyogenes* regulatory mechanisms and behavior toward immunomodulatory substances. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(7-8):513-523.
 - Roberts, S.A., Churchward, G.G., Scott, J.R. (2007) Unraveling the regulatory network in *Streptococcus pyogenes*: the global response regulator CovR represses *rivR* directly. *J. Bacteriol.* 189(4):1459-1463.
 - Roberts, S.A., Scott, J.R. (2007) RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol. Microbiol.* 66(6):1506-1522.
 - Robertson, G.T., Zhao, J., Desai, B.V., Coleman, W.H., Nicas, T.I., Gilmour, R., Grinius, L., Morrison, D.A., Winkler, M.E. (2002) Vancomycin tolerance induced by erythromycin but not by loss of *vncRS*, *vex3*, or *pep27* function in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 184(24):6987-7000.
 - Rogers, P.D., Liu, T.T., Barker, K.S., Hilliard, G.M., English, B.K., Thornton, J., Swiatlo, E., McDaniel, L.S. (2007) Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(4):616-626.
 - 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(2):333-341.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd ed.). CSH Press, New York.
 - Schaefer, B.C. (1995) Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Anal. Biochem.* 227: 255-273.
-

- Schäfer, F. (2007) Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Der Einfluss der CiaRH regulierten Gene auf die genetische Kompetenz. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- 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(12):3969-3979.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B., Losick, R. (2005) Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187(19):6641-6650.
- Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., Laub, M.T. (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol.* 3(10):e334.
- Slauch, J.M., Silhavy, T.J. (1989) Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 210(2):281-292.
- Smits, W.K., Hoa, T.T., Hamoen, L.W., Kuipers, O.P., Dubnau, D. (2007) Antirepression as a second mechanism of transcriptional activation by a minor groove binding protein. *Mol. Microbiol.* 64(2):368-381.
- Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C., Masure, H.R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 19(4):803-813.
- Standish, A.J., Stroehel, U.H., Paton, J.C. (2007) The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J. Bacteriol.* 189(15):5591-5600.
- Stock, J., Da Re, S. (2000) Signal transduction: Response regulators on and off. *Curr. Biol.* 10:R420-R424.
- Stock, A.M., Guhaniyogi, J. (2006) A New Perspective on Response Regulator Activation. *J. Bacteriol.* 188(21):7328-7330.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183-215.
- 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(11):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(2):939-945.
 - Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J. (2002) Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* 148(Pt 7):2065-2077.
 - Taylor, E.J., Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Vincent, F., Brzozowski, A.M., Dupont, C., Shareck, F., Centeno, M.S., Prates, J.A., Puchart, V., Ferreira, L.M., Fontes, C.M., Biely, P., Davies, G.J. (2006) Structure and activity of two metal ion-dependent acetylxyloxyesterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. *J. Biol. Chem.* 281(16):10968-10975.
 - 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(5529): 498-506.
 - Thornsberry, C., Ogilvie, P.T., Holley, H.P. Jr., Sahm, D.F. (1999) Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(11): 2612-2623.
 - 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, K.R. (2000) A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 35: 566-576.
 - Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., Weisblum, B. (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J. Bacteriol.* 186(23):8123-8136.
 - Ulrich, L.E., Koonin, E.V., Zhulin, I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13(2):52-56.
 - Vickerman, M.M., Iobst, S., Jesionowski, A.M., Gill, S.R. (2007) Genome-wide transcriptional changes in *Streptococcus gordonii* in response to competence signaling peptide. *J. Bacteriol.* (21):7799-7807.

- Vogel, J., Bartels, V., Tang, T.H., Churakov, G., Slagter-Jäger, J.G., Hüttenhofer, A., Wagner, E.G. (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31(22):6435-6443.
- Volz, C. (2008) Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie Piperacillin-resistenter Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, in Vorbereitung, Universität Kaiserslautern.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007) Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 29(5):1162-1171.
- Ween, O., Gaustad, P., Håvarstein, L.S. (1999) Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 33(4):817-827.
- West, A.H., Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26(6):369-376.
- Wicker, T., Schlagenhauf, E., Graner, A., Close, T.J., Keller, B., Stein, N. (2006) 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics* 7:275.
- Wolanin, P.M., Thomason, P.A., Stock, J.B. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 25;3(10):REVIEWS3013.
- Wolfe, A.J. (2005) The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(1):12-50.
- Xu, P., Alves, J.M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L.S., Manque, P., Ge, X., Serrano, M.G., Puiu, D., Hendricks, S., Wang, Y., Chaplin, M.D., Akan, D., Paik, S., Peterson, D.L., Macrina, F.L., Buck, G.A. (2007) Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J. Bacteriol.* 189(8):3166-3175.
- Yebra, M.J., Monedero, V., Zúñiga, M., Deutscher, J., Pérez-Martínez, G. (2006) Molecular analysis of the glucose-specific phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system from *Lactobacillus casei* and its links with the control of sugar metabolism. *Microbiology* 152(Pt 1):95-104.
- Yoshida, T., Qin, L., Egger, L.A., Inouye, M. (2006) Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J. Biol. Chem.* 281(25):17114-17123.
- Youngman, P., Poth, H., Green, B., York, K., Olmedo, G., Smith, K. (1989) Methods for genetic Manipulation, Cloning and Functional Analysis of Sporulation Genes in

Bacillus subtilis. In: Regulation of Prokaryotic Development (eds. Smith, I., Slepecky, R.A., Setlow, P.), S.65-87. ASM, Washington, DC.

- Zähler, 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(2):187-191.
- Zähler, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Merai, M., Hakenbeck, R. (2002) The *ciaR/ciaH* regulatory network in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechn.* 4: 211-216.
- Zhang, J.R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W., Tuomanen, E.I. (1999) Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol. Microbiol.* 31(5):1477-1488.
- Zhang, X., Hulett, F.M. (2000) ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: *ctaA* promoter regulation. *Mol. Microbiol.* 37:1208-1219.

Publikationen

Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2007) Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol. Microbiol.* 66(1):110-126.

Halfmann, A., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2007) A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 268(2):217-224.

Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188(16):5797-5805.

Vielen Dank!

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich für die Überlassung des Themas, das stetige Interesse und die Möglichkeit, den Geheimnissen des CiaRH Regulons auf die Spur zu kommen.

Herrn Prof. Dr. John A. Cullum danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Ein ganz besonderer Dank an Herrn PD Dr. Reinhold Brückner. Seine Ideen und seine Unterstützung während der letzten Jahre haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Vielen Dank für die großartige Betreuung, die vielen hilfreichen Ratschläge und das immer offene Ohr für alles!

Ein besonderer Dank auch an Dalia, Petra, Márta und Carsten für die schöne Zeit, die wir zusammen hatten und das „private Interesse an meiner Person“ ;-).

Herrn Dr. Patrick Maurer danke ich für die erstklassige Einführung in die Welt der Proteine.

Ein Dank auch an Ulrike Klein und Brigitte Schlegler, die den Alltag im Labor immer am Laufen gehalten haben und dadurch auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Patrick Marx danke ich für die Hilfe bei den Experimenten mit CiaRD51A, Sandra Magin für die Arbeiten mit *dlt* und Anette Schedler für den Versuch, die Geheimnisse der mal-Region zu lüften.

Jessi und Sandra danke ich für die nette Büro- und Laborgemeinschaft und für die vielen interessanten Fragen, zu denen ich leider zu oft nicht wirklich die für sie richtigen Antworten wusste.

Thomas, Jens und Manuel sei für die lustige Zeit mit ihnen gedankt. Was wäre das Internet ohne IMDb?

Für die angenehme und nie langweilige Laboratmosphäre danke ich allen Kolleginnen und Kollegen der letzten vier Jahre: Abderrahim, Andreas, Anette, Barbara, Bernhard, Brigitte, Brigitte, Carsten, Christine, Dalia, Eva, Fang, Friederike, Georg, Ilka, Irma, Jens, Jessica, Jürgen, Julia, Katya, Kerstin, Laurent, Linda, Magdalena, Manuel, Markus, Márta, Melanie, Michael, Michèle, Michelle, Miriam, Nadine, Oliver, Patrick, Patrick, Peter, Petra, Philipp, Radek, Regine, Reinhold, Sabine, Sandra, Sonja, Stuart, Thomas, Tina, Tobias, Ulrike, Ulrike, Yvonne, Yvonne – fehlt noch jemand? Denen sei natürlich auch gedankt!

Zuletzt ein besonderer Dank an meine Eltern und meine Familie für ihre immer vorhandene Unterstützung und an Niklas, Benjamin und Killian für die Freude die sie bereiten und ihre Anregungen, kreative Pausen während des Schreibens dieser Arbeit einzulegen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Alexander Nikolaus Halfmann
Spitzäckerstr. 19
67685 Weilerbach

Geburtsdatum 2.5.1979
Geburtsort Kaiserslautern
Familienstand ledig
Nationalität deutsch

Ausbildung

6/1998 Abitur, Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern
10/1998 bis 9/1999 Studium der Rechtswissenschaft, Universität des Saarlandes
10/1999 bis 10/2004 Studium der Biologie, TU Kaiserslautern; Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Zoologie und Innovationsmanagement für Biologen; Thema der Diplomarbeit: „Evaluierung eines Reportersystems für *Streptococcus pneumoniae*“
seit 12/2004 Promotion, TU Kaiserslautern, Abteilung Mikrobiologie
Thema: „Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*“

Berufliche Tätigkeit

seit 12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, TU Kaiserslautern, Abteilung Mikrobiologie

